UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

N-acetilcisteína e dapsona: avaliação da toxicidade hematológica e bioquímica em ratos Wistar.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do título de Mestre em Toxicologia, Área de concentração: Toxicologia

Orientado: Mauricio Homem de Mello

Orientador: Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz

Ribeirão Preto
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Homem de Mello, Mauricio

N-acetilcisteína e dapsona: avaliação da toxicidade hematológica e bioquímica em ratos Wistar. Ribeirão Preto, 2005.

120p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Queiroz, Regina Helena Costa.

1. Dapsona. 2. N-Acetilcisteína. 3. Metemoglobina.

Mauricio Homem de Mello

N-acetilcisteína e dapsona: avaliação da toxicidade hematológica e bioquímica
em ratos Wistar.

Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Profa.Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini Machado
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

Profa Dra Regina Helena Costa Queiroz (orientadora)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em 23/06/2005

À Verdade

...Incondicional, que guia por
caminhos de retidão e que leva a
vários destinos, mas com um único
fim: a elevação da Consciência...

Dedicatória

À minha mãe, Nicete,
Por todo o amor, superproteção,
Incompreensão, repreensão e ensinamentos...
Que me fizeram crescer e amadurecer.
E que assim me transformou em alguém de palavra.
Obrigado por me ensinar sobre a Verdade.

À Camila,
Por toda a dedicação, esforço,
Companheirismo, braveza e bravura...
Que me fizeram aprender a aprender.
E que assim me deu um pouco de sabedoria.
Obrigado por me amar desse tanto.

À minha irmã, Paula,
Por toda a beleza, idoneidade,
Sensatez, bondade e fertilidade...
Que me deu uma linda sobrinha, a Thais.
E que assim me deu um senso maior de família.
Obrigado por ser quem é.

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz, minha orientadora, pessoa de boa índole, uma educadora no sentido da palavra. Agradecer é pouco, mas mesmo assim obrigado por me dar orientação na vida.

Ao meu irmão, Luiz Felipe, que dentro de sua introspecção me ensinou que amor de irmão independe de conversa ou palavras, basta ser. Continue com esses acordes, Fê.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, que me forneceu conhecimentos, formou meu espírito crítico, me deu oportunidades e me ensinou uma pequenina, mas importantíssima coisa, a responsabilidade.

Agradecimentos

Aos amigos e companheiros do laboratório de toxicologia Wilson, Sonia, Cidinha e Natália, por toda a colaboração no projeto. Vocês têm consciências realmente iluminadas. É muita bondade concentrada. Sem vocês esta dissertação não sairia!

Aos amigos do biotério Reinaldo, Aldo e Ronaldo que me ajudaram demais, cuidaram dos animais com muito esmero e que se tornaram grandes amigos. Nossos papos na porta do biotério são inesquecíveis. Obrigado, amigos.

À Zita Maria de Oliveira Gregório, do laboratório de hematologia, por todas as análises efetuadas. Este trabalho e eu devemos muito a você.

À Adélia Cristina de Oliveira Cintra, do laboratório de toxinologia, pelas análises bioquímicas realizadas. Mais uma vez, obrigado Adélia, obrigado.

Aos Profs. Dr. Antonio Cardozo dos Santos e Dra. Ana Maria de Souza, por todo o suporte técnico, paciência, atenção e orientação dentro deste trabalho.

À Profa. Dra. Suely Vilela Sampaio, por ter me oferecido a oportunidade de ingressar no mundo da pesquisa quando me aceitou em seu laboratório para fazer Iniciação Científica, e lá fiquei por três anos. Minha base na ciência devo àquele laboratório.

À D. Nair e Edson, por terem me acolhido de maneira tão gratificante. É quase minha segunda casa. Obrigado por todos os almoços, jantares, e por terem feito uma filha tão especial.

Ao Prof. Dr. Milton Soares de Campos, por ter me criado para o mundo, me fornecer sustento e carinho. Suas lembranças até meados de abril de 2005 são indescritivelmente boas.

Ao ex-professor Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, ou melhor, meu amigo Betão. Apesar de um pouco distantes ultimamente, seus ensinamentos de vida estão mais vivos do que nunca em minha mente.

Aos amigos do Drogão Super Dirson, Matheus, Julio, Alexandre, Rogério, Wendy, Samanta, Willians, Roberta e todos os outros que me toleraram e me ensinaram muita coisa. Obrigado por estes dois anos e meio de convivência.

Aos amigos da Drogacenter (empresa que pagou meu salário até agora e me deu condições de viver e poder realizar esta dissertação) Renato, Wayne, Regina Irene, Ângela, Roberto, Soleane, Carla, Karina, Alexandra, Rogério, Paola, Rose e todos aqueles que passaram pela empresa e deixaram suas marcas mais que positivas (Lucia, Gisele, Marcão, Flávio... são tantos...).

Ao meu cunhado Hugo que colaborou de forma participativa na produção da minha linda sobrinha Thais.

Ao pessoalzinho da farmacotécnica, Camila, Renata, Priscila, Mônica, Morango, Maria Paula, Alessandra e Zé Maria. Êta que pessoal mais animado e gente boa!

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas, pela paciência em me agüentar como presença constante em seu laboratório, e pelo empréstimo do poderoso microscópio para as fotos.

A todos os docentes e servidores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela amizade, colaboração, e por terem participado do curso de minha formação.

Aos eternos amigos Guilherme, Zé Eduardo e Livia (vai exonu). Já falei, eternos amigos.

Ao grande amigo Walter, ou melhor, Tatu, que me acolheu em sua casa em um momento de grande dificuldade para mim, e nunca implicou com meu modo pouco organizado de manter as coisas.

A todos aqueles que não citei aqui, mas que contribuíram de alguma maneira pra que eu terminasse essa dissertação. Muito obrigado a todos.

Aos amigos que contribuíram da maneira mais dedicada para que este trabalho desse certo, meus 427 amigos Wistar, que forneceram, sem reclamar nem pestanejar, suas vidas em experimentos preparatórios, definitivos, repetições dos definitivos, confirmatórios e conclusivos. Sem vocês, este trabalho não teria nem iniciado. Espero que eu consiga crescer o suficiente para um dia poder encontrar com vocês no céu.

À FAPESP, por financiar os experimentos através de verba destinada ao projeto.

SUMÁRIO

Resumo	iii
Summary	iv
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Aspectos Gerais	5
1.1.1. Dapsona	5
1.1.2. Hemoglobina	16
1.1.3. Metemoglobina	18
1.1.4. N-acetilcisteína	19
1.1.5. Glutathione	21
1.1.6. Bilirrubina	25
1.1.7. Lactato Desidrogenase	28
1.1.8. Hemograma	29
1.1.9. Reticulócitos	30
1.1.10 Haptoglobina	31
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Animais	36
3.2. Via de Administração dos Fármacos e Regime de Dosagem	36
3.3. Coleta de Material	37
3.4. Preparo das Amostras	38
3.4.1. Sangue com Heparina (tubo 1)	38
3.4.2. Sangue com EDTA (Tubo 2)	38
3.4.3. Sangue sem Anticoagulante (Tubo 3)	38
3.5. Análise da Metemoglobina por Espectrofotometria	39
3.5.1. Método de Evelyn e Malloy (mod. Harrison & Jollow, 1992)	39
3.6. Determinação da Glutathione Eritrocitária	40
3.6.1. Método de Beutler, Duron e Kelly (1963)	40
3.7. Provas Bioquímicas	41
3.7.1. Bilirrubinas	41
3.7.2. Lactato Desidrogenase	42
3.8. Provas Hematológicas	44
3.8.1. Contagem de Eritrócitos	44
3.8.2. Determinação do Hematócrito	45
3.8.3. Índices Eritrocitométricos	45
3.8.3.1. Volume Corpuscular Médio (VCM)	46
3.8.3.2. Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	46
3.8.3.3. Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	46
3.8.4. Coloração das Extensões Sanguíneas	47
3.8.5. Contagem de Reticulócitos	48
3.8.6. Fragilidade Osmótica	49
3.8.7. Haptoglobina	51
3.9. Análise Estatística	51

4. RESULTADOS	53
4.1. Análise da Metemoglobina por Espectrofotometria	53
4.2. Determinação da Glutathione Eritrocitária	55
4.3. Bilirrubinas	57
4.3.1. Bilirrubina Total	57
4.3.2. Bilirrubina Direta	59
4.3.3. Bilirrubina Indireta	61
4.4. Lactato Desidrogenase	63
4.5. Contagem de Eritrócitos	65
4.6. Determinação do Hematócrito	67
4.7. Hemoglobina	69
4.8. Índices Eritrocitométricos	71
4.8.1. Volume Corpuscular Médio (VCM)	71
4.8.2. Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	73
4.8.3. Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	75
4.9. Contagem de Reticulócitos	77
4.10. Coloração das Extensões Sangüíneas	79
4.11. Fragilidade Osmótica	81
4.12. Haptoglobina	82
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

RESUMO

Homem de Mello, M. **N-acetilcisteína e dapsona: avaliação da toxicidade hematológica e bioquímica em ratos Wistar**. 2005, 120 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

A dapsona, fármaco de escolha no tratamento da hanseníase, induz hemotoxicidade que está diretamente relacionada à N-hidroxilação sofrida pelo fármaco, uma de suas principais vias de biotransformação, devido à formação de produtos reativos, as N-hidroxisaminas. Com o objetivo de se avaliar a influência da N-acetilcisteína na toxicidade hematológica e bioquímica da dapsona, foi administrado em ratos Wistar, por via intraperitoneal, 40 mg/kg de dapsona em monoterapia e associada à N-acetilcisteína na dose de 75 mg/kg, concomitantemente e previamente. Os resultados obtidos mostraram que a interação entre a N-acetilcisteína e a dapsona potenciava a hemotoxicidade induzida pela dapsona, principalmente pelo incremento da porcentagem de metemoglobinemia. Em relação aos outros parâmetros estudados: glutatona, bilirrubina, lactato desidrogenase, hemograma completo, contagem de reticulócitos, fragilidade osmótica e dosagem de haptoglobina, os resultados encontrados foram controversos e pouco conclusivos. Os dados observados no presente trabalho permitiram evidenciar que a associação da N-acetilcisteína potencializou a hemotoxicidade da dapsona, como comprovado pelas análises estatísticas de variância (ANOVA), através do teste de Tukey-Kramer, com nível de significância fixado em $p < 0,05$.

Palavras-chave: Dapsona, N-acetilcisteína, Metemoglobina, N-hidroxisamina

SUMMARY

Homem de Mello, M. **N-acetylcysteine and dapsone: evaluation on hematological and biochemical toxicity in Wistar rats.** 2005, 120 f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

Dapsone is the choice drug to treat leprosy, but induces hemotoxicity. Its damage is directly related to N-hydroxylated metabolites. This is the principal route of metabolism for dapsone, and produces reactive compounds, N-hydroxylamines. To evaluate the influence of N-acetylcysteine on induced hematological and biochemical toxicity by dapsone, it was given to Wistar rats as a monotherapy, at 40 mg/kg or associated to N-acetylcysteine at 75 mg/kg, at the same time or previously. The obtained results shows that the interaction between N-acetylcysteine and dapsone increased the hemotoxicity induced by dapsone, mainly on the methemoglobin percentage increase. Regarding the other studied parameters: glutathione, bilirubin, lactate dehydrogenase (LDH), complete hemogram, reticulocytes counting, osmotic fragility and haptoglobin dosage, results were confusing and lack of conclusions. Data observed in this project allowed to affirm that N-acetylcysteine association improved the dapsone hemotoxicity as showed by statistical variance analysis (ANOVA), by Tukey-Kramer test, with confidence level fixed at p value <0,05.

Key Words: Dapsona, N-acetilcisteína, Metemoglobina, N-hidroxilamina

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é considerada um problema de saúde pública com conseqüências sociais de discriminação e estigmatização. Atualmente afeta mais de um milhão de pessoas na África, Ásia, América do Sul e ilhas do Pacífico. A Organização Mundial de Saúde (OMS ou WHO – World Health Organization) estima que entre dois a três milhões de pessoas já estão inválidas como resultado desta patologia. Embora todos os casos registrados estejam em tratamento, estima-se que durante o período de 2000 até 2005, cerca de dois milhões e quinhentas mil pessoas afetadas pela hanseníase necessitaram ser diagnosticadas e tratadas (WHO, 2005).

A OMS propôs uma estratégia para retirar a hanseníase da lista de problemas de saúde pública até o final de 2005, baseada em orientações técnicas e em poliquimioterapia (PQT) utilizando clofazimina, rifampicina e dapsona. Esta estratégia, que foi implementada em todos os países onde a hanseníase alcançava patamares de prevalência próximos ou maiores que um caso por 10000 habitantes, obteve bastante êxito. Até o final de 2003, 113 dos 122 países que possuíam índices epidemiológicos alarmantes em 1985 para a hanseníase, conseguiram eliminar, pelo menos nos índices nacionais, esta patologia de seus quadros de problemas de saúde pública. Nas últimas duas décadas, a prevalência

global da hanseníase caiu cerca de 90% e mais de 14 milhões de pacientes foram curados (WHO, 2005).

Hoje a hanseníase permanece um problema de saúde pública grave apenas em nove países, na África (Angola, República Centro-Africana, República Democrática do Congo, Madagascar, Moçambique e Tanzânia), Ásia (Índia e Nepal) e América Latina (Brasil) (WHO, 2005).

O Brasil possui hoje a maior prevalência de hanseníase do mundo (3,99 casos para cada 10000 habitantes), e em números absolutos somente a Índia possui mais casos. Em 2003, no estado do Mato Grosso, a taxa de pessoas infectadas pela hanseníase alcançava 22 casos em cada 10000 habitantes (OPAS, 2004).

A hanseníase é causada por um bacilo denominado *Mycobacterium leprae*, pode ser transmitido por contato íntimo e prolongado. As primeiras vítimas são pessoas próximas – familiares e amigos, morando na mesma casa. Para chegar à doença, a pessoa precisa somar duas condições: contrair o bacilo e ter organismo suscetível. O fator natural de defesa do organismo é conhecido a partir do teste de Mitsuda – resposta positiva ao reagente indica resistência ao bacilo de Hansen, e negativa indica vulnerabilidade. Dois grupos de doentes caracterizam o mal de Hansen: o paucibacilar – com poucos bacilos, não contagioso, apresentando lesões dispostas assimetricamente e o multibacilar – com muitos bacilos, contagioso em qualquer fase. Os doentes multibacilares sem tratamento ou com

tratamento irregular eliminam bacilos de Hansen pelas vias aéreas superiores – boca e nariz, e também através das feridas (WHO, 2005).

O tratamento para a hanseníase é realizado de acordo com tipo de infecção causada pelo *Mycobacterium leprae*. A hanseníase paucibacilar é tratada durante seis meses com dapsona e rifampicina. A hanseníase multibacilar é tratada durante dois anos com rifampicina, clofazimina e dapsona (Rang et al., 1997).

As reações adversas, oriundas da utilização da dapsona, estão principalmente correlacionadas ao sistema hematológico, apresentando quadros severos de metemoglobinemia e anemia hemolítica. São também relatados casos de agranulocitose, problemas hepáticos e renais, entre outros (Coleman, 1995).

Essa hemotoxicidade está diretamente relacionada à N-hidroxilação sofrida pela dapsona, uma das principais vias de biodegradação do fármaco, devido à formação de produtos reativos, as hidroxilaminas.

A N-acetilcisteína é um fármaco antioxidante que é utilizado com sucesso no tratamento da intoxicação por paracetamol por neutralizar produtos reativos, e por este mecanismo minimiza lesões teciduais.

Desta forma, este projeto tem como objetivo principal investigar em ratos Wistar a interação da N-acetilcisteína com a dapsona, aliando ao efeito farmacológico da dapsona um menor risco de reações adversas, principalmente a metemoglobinemia reação dose dependente.

1.1. Aspectos Gerais

1.1.1. Dapsona

Até 1980, a dapsona (4, 4' diaminodifenil sulfona, ou DDS) era o fármaco de escolha para o tratamento da hanseníase, porém a dificuldade no controle de bacilos resistentes, frente ao emprego de medicamentos administrados isoladamente, especialmente a sulfona e rifampicina, fez com que o Comitê de Peritos em Quimioterapia da Organização Mundial de Saúde definisse em 1981, novos esquemas terapêuticos (Cambau et al., 1997). A associação da dapsona, rifampicina e clofazimina no tratamento da hanseníase, implantada de forma gradual nos países considerados endêmicos, permitiu um controle mais efetivo na transmissão e evolução da doença.

A DDS, fármaco bacteriostático cujo mecanismo de ação está relacionado com a inibição da síntese do ácido fólico pela competição com o ácido p-aminobenzóico, foi sintetizada em 1908, porém sua atividade antibacteriana foi descoberta somente em 1937. A DDS, desde 1940, é empregada com êxito no tratamento da hanseníase, seu principal uso terapêutico (Bleumink, 1992; Brasil MS., 1989; Douglas, 1980).

A DDS possui também uma ação antiinflamatória, conhecida desde o início da década de 1950. Esta atividade não tem correlação com sua ação antibacteriana, e até hoje não é completamente compreendida.

Sabe-se que alguns tipos de inflamação respondem bem ao uso da DDS, como a vasculite leucocitoclástica, artrite reumatóide e dermatite herpetiforme. A DDS já se mostrou extremamente efetiva na redução do prurido e das lesões que acompanham a dermatite herpetiforme. Esta é uma patologia de manifestação cutânea de sensibilidade ao glúten, e a melhoria dos sintomas ocorre simplesmente pela retirada deste composto da alimentação. Entretanto, uma supressão adicional dos sintomas utilizando-se DDS é normalmente essencial, já que somente a retirada do glúten da alimentação pode demorar meses para demonstrar algum resultado (Coleman, 1993).

Doenças inflamatórias que respondem à DDS são invariavelmente caracterizadas por uma infiltração de um grande número de leucócitos polimorfonucleares (predominantemente neutrófilos) no tecido afetado. Uma vez ativados, os neutrófilos liberam mieloperoxidase, uma enzima que contém ferro e está acoplada à ativação da NADPH oxidase. A oxidase converte oxigênio a superóxido, formando peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou através da catálise da enzima superóxido desmutase. O peróxido de hidrogênio se combina com a mieloperoxidase para produzir uma forma da enzima denominada “composto I”, que é altamente oxidante. O Composto I reage com íons cloreto, para formar ácido hipocloroso, o mais potente oxidante neutrofílico. Este processo consome grandes quantidades de oxigênio, e um único neutrófilo é capaz de produzir ácido suficiente para eliminar, em

um segundo, cerca de 150 bactérias. Na ausência de íons cloreto ou no excesso de peróxido de hidrogênio, o Composto I da mieloperoxidase é convertido a Composto II, que é inativo. A DDS parece se comportar como um substrato fraco da peroxidase, e converte a enzima a Composto II, assim prevenindo a formação do ácido hipocloroso (Coleman, 1993).

Para que os neutrófilos sejam direcionados para uma lesão extravascular, devem primeiramente aderir às células endoteliais vasculares, e então penetrar a parede do vaso. Esta reação de adesão é mediada por receptores de integrinas, e a DDS mostrou-se efetiva na supressão da migração de neutrófilos, através do bloqueio da função de adesão mediada por integrina (Coleman, 1993).

No homem, a DDS é extensivamente biotransformada, tendo como via principal a acetilação que se processa à custa de enzimas designadas de N-acetiltransferases (NAT) (Figura 1). Estas enzimas estão presentes principalmente no fígado e mucosa jejunal e são responsáveis pela formação do produto de biotransformação, monoacetildapsona (MADDS). Um grupo amino da dapsona é acetilado, formando a MADDS, a desacetilação também pode ocorrer, retornando à forma inalterada-dapsona (Grossman & Jollow, 1988). A diacetilação, assim como a desacetilação da MADDS, são reações que também podem ocorrer, formando a diacetildapsona e a dapsona, respectivamente (Zuidema et al., 1986; Grossman et al., 1992).

A constante de equilíbrio entre a acetilação e a desacetilação ocorre dentro de poucas horas após a administração oral, e a taxa de acetilação parece ser elevada, o que indica que a desacetilação é um processo mais lento. Essa baixa taxa de desacetilação pode ser devida à ligação da MADDS às proteínas plasmáticas.

A hidroxilação é o segundo principal caminho de biotransformação no metabolismo da DDS e parece ser o responsável pelos efeitos tóxicos no sistema hematológico (Tingle et al., 1990; Grossman et al., 1992). No entanto, esta é uma fase menos estudada que a acetilação. A instabilidade química e a reatividade dos produtos hidroxilados, dificultam a determinação destes, nos fluidos biológicos. Um outro inconveniente são as baixas concentrações plasmáticas (Zuidema et al., 1986).

A N-hidroxilação é efetuada no fígado, pelo sistema oxidase de função mista – citocromo P₄₅₀ presente no retículo endoplasmático. Essa reação ocorre na presença de oxigênio molecular e NADPH. (Zuidema et al., 1986).

A dapsona é N-hidroxilada *“in vitro”* e *“in vivo”*, em ratos machos Wistar através também de enzimas hepáticas. Esses animais são acetiladores lentos da dapsona, o que acarreta uma maior hemotoxicidade (Tingle et al., 1990).

Figura 1 - Biotransformação da dapsona e monoacetildapsona. NAT = N-acetiltransferase, CE = carboxiesterase, P₄₅₀ = citocromo P₄₅₀, DDS = dapsona, DDS-NOH = dapsona hidroxilamina, MADDS = monoacetildapsona, MADDS-NOH = monoacetildapsona hidroxilamina. (Grossman & Jollow, 1988).

Os quadros de metemoglobinemia e anemia hemolítica são efeitos adversos correlacionados à exposição à DDS freqüentemente encontrados na literatura. (Coleman, 1995; Landers et al., 1996; Queiroz et al., 1997; Ward & McCarthy, 1998; Salamat & Watson, 2003). Agranulocitose, problemas hepáticos e renais, dermatite esfoliativa, neuropatia periférica, febre, cefaléias, psicoses e fotodermatite, também são outros efeitos citados, porém com menor freqüência (Pavithran & Satish, 1997; Leslie et al., 2003).

Reiter & Cimoch (1987), relataram um caso de metemoglobinemia em paciente aidético recebendo DDS em que o paciente desenvolveu dor de cabeça, náusea, taquicardia e cianose, seis dias após o início do tratamento. A concentração de metemoglobina foi de 23,9%. O tratamento foi interrompido e a redução na concentração de metemoglobina ocorreu dentro de 24h.

Ward & McCarthy, em 1998, observaram desenvolvimento de dispnéia acompanhada de uma elevação dos níveis de metemoglobina, após nove dias de tratamento com DDS, através de estudos em pacientes transplantados submetidos à hemodiálise.

Chalasani et al (1994), em estudo clínico relataram o primeiro caso de uma paciente de 34 anos infectada com HIV, que apresentou anemia hemolítica e hepatite seguida de morte, devido à reação de hipersensibilidade à DDS.

Timothy et al (1997), através de estudos em humanos, compararam os metabólitos hidroxilados da DDS e do sulfametoxazol, concluindo que tanto a dapsona hidroxilamina, como a sulfametoxazol hidroxilamina, induziram a formação de metemoglobinemia, sendo que a dapsona hidroxilamina foi significativamente mais potente, na indução da formação de metemoglobina. Os autores observaram ainda que a presença de dapsona hidroxilamina e monoacetildapsona hidroxilamina em eritrócitos “in vivo”, poderia aumentar a concentração intracelular de espécies oxidativas, relacionadas com os efeitos tóxicos da DDS.

Grossman et al (1992), observaram que células deficientes de glicose-6-fosfato-desidrogenase são mais suscetíveis à atividade hemolítica da DDS hidroxilamina, com um aumento na depleção de glutathiona dos eritrócitos.

A toxicidade da DDS pode ser categorizada tanto como dose dependente ou de reação idiossincrática. Os efeitos dose dependentes incluem as reações hematológicas da terapia com DDS, como metemoglobinemia e hemólise. A administração de DDS a 100 mg/dia em pacientes normais pode resultar em significativa metemoglobinemia, que na realidade não é causada exatamente pela DDS, mas pelo seu metabólito hidroxilamina.

A anemia hemolítica, causada pelo uso da DDS, é associada a uma desnaturação oxidativa na membrana dos eritrócitos, aumentando sua rigidez, favorecendo a recaptação esplênica e acelerando os

processos de hemólise celular. Relatou-se ainda, a quebra de hidroperóxidos lipídicos podendo levar à formação de aldeídos, incluindo malonildialdeído, que é capaz de se ligar em aminofosfolípidos e proteínas, formando agregados de alto peso molecular. Estes agregados, muitas vezes são observados nas membranas dos eritrócitos, principalmente em indivíduos deficientes em glicose-6-fosfato-desidrogenase. Foi observado também, que durante o processo hemolítico, a homeostase do cálcio é comprometida, ativando sistemas proteolíticos e influenciando em aspectos funcionais e estruturais da membrana com conseqüente lise e morte celular (Hochstein, 1988; Coleman, 1993, 1995).

Concentrações plasmáticas de dapsona e de seu produto de biotransformação, monoacetildapsona, podem ser determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Após a administração oral, o fármaco é lentamente absorvido, atingindo em um tempo médio de 4 horas a concentração máxima no plasma, com um tempo de meia-vida de absorção em torno de 1,1 hora após a administração de 100 mg (Edstein et al., 1990).

De acordo com os estudos de biodisponibilidade, realizados em pacientes hansenianos, a dapsona apresenta uma absorção incompleta, a qual é estimada em torno de 70 a 80%, segundo Zuidema et al. (1986).

A dapsona e a monoacetildapsona parecem ter o mesmo tempo de meia-vida de eliminação com uma variação interindividual de 14 a 83

horas e valores médios em torno de 30 horas. Geralmente, 90% de uma dose única de 100mg do fármaco é eliminada, em média, em 9 dias. Já em tratamentos prolongados, o fármaco pode ser encontrado nos fluidos biológicos até por um período de 35 dias após sua administração. Possivelmente, a explicação para o longo tempo de meia-vida, seja a circulação enteroepática e a extensa ligação às proteínas plasmáticas (Zuidema et al., 1986).

A dapsona se liga às proteínas plasmáticas entre 70 a 90%. O principal produto de biotransformação circulante no organismo é a monoacetildapsona (MADDS), que tem uma afinidade pelas proteínas 20 a 25 vezes maior que a dapsona, com ligação de 99% a estas proteínas (Zuidema et al., 1986).

Na saliva, a concentração de dapsona é cerca de 18 a 27% de sua concentração plasmática. Já a MADDS apresenta na saliva cerca de 1 a 2% de sua concentração plasmática (Zuidema et al., 1986).

A dapsona parece ser largamente distribuída nos tecidos. A concentração na maioria dos órgãos não difere significativamente do sangue. Há descrições de acúmulo no fígado e na pele (Zuidema et al., 1986).

O acúmulo periférico encontrado em ratos pode explicar o grande volume de distribuição – 1,5 L/kg de dapsona. Esse valor aumenta para 1,9 L/kg em administrações simultâneas com a pirimetamina. No entanto, alguns autores consideram este alto volume de distribuição, um resultado

de artefato nos cálculos, pois estes são realizados considerando-se a absorção completa (Zuidema et al., 1986).

Uma análise significativa em relação ao estudo compartimental das sulfonamidas ainda não foi descrita. A dapsona penetra com facilidade no nervo ciático de cachorros e carneiros e a concentração no tecido nervoso é equivalente à plasmática. No entanto, a dapsona não é capaz de penetrar nas células nervosas de Schwann do rato com neuropatia hanseniana avançada. O *Mycobacterium leprae* instala-se nas células de Schwann e neste local a dapsona é inativa (Zuidema et al., 1986).

Em relação à excreção dos derivados hidroxilados livres ou conjugados, a literatura tem se mostrado um pouco controversa. Porcentagens em torno de 2 a 7% na forma livre e 30 a 50% na forma conjugada têm sido encontradas. A maioria dos autores demonstram que a eliminação total dos produtos N-hidroxilados está em torno de 50% de uma dose oral (Zuidema et al., 1986).

Dapsona e MADDS são principalmente encontradas na urina na forma conjugada com o ácido glicurônico. Os produtos conjugados não são encontrados no sangue, o que mostra uma eliminação renal rápida. Os produtos N-hidroxilados, como já foi relatado, são eliminados 2 a 7% na forma livre e 30 a 50% na forma conjugada. Possivelmente, os amino-N-glicuronídeos são os principais produtos urinários N-OH-dapsona conjugados (Zuidema et al., 1986).

A excreção renal da dapsona em sua forma inalterada é determinada através de métodos cromatográficos, principalmente por CLAE (Zuidema et al., 1986). A literatura mostra que frações de 5 a 15% da dose são excretadas através dos rins. A quantidade de MADDS excretada na urina é somente uma pequena porcentagem da dose, e depende provavelmente da taxa de acetilação. A ligação às proteínas plasmáticas de praticamente 100% de MADDS obviamente resulta em uma taxa de filtração glomerular baixa. Acredita-se que a MADDS seja largamente eliminada pela desacetilação, na forma de dapsona, a qual é subsequente excretada na urina (Zuidema et al., 1986).

Após a administração oral da dapsona, o composto inalterado, MADDS, dapsona-NOH e possivelmente NOH-MADDS são encontrados em baixas concentrações na urina. Esses metabólitos são parcialmente conjugados, principalmente com o ácido glicurônico e menos extensivamente com os N-sulfatos (Zuidema et al, 1986).

A dose diária de dapsona no tratamento da hanseníase preconizada pela Organização Mundial da Saúde é de 50 a 100 mg/dia que corresponde a um intervalo de concentração plasmática, no estado de equilíbrio, de 1 a 3,5 mg/L (Brasil MS., 1999). Essas concentrações são consideradas altas, frente a concentração inibitória mínima para o *Mycobacterium leprae*. Observou-se em camundongos um intervalo de concentração plasmático de 2,5 a 10 µg/L. No entanto, em concentrações baixas o desenvolvimento de resistência parece ser

favorecido. Desta forma, o intervalo terapêutico proposto é de 0,5 a 5 mg/L (Zuidema et al., 1986).

É difícil prever com segurança qual a real influência na biodisponibilidade da dapsona, na associação medicamentosa da politerapia, pois os estudos ainda são precários.

1.1.2. Hemoglobina

A hemoglobina, proteína globular tetramérica, é o principal constituinte do eritrócito correspondendo a cerca de 90% do peso seco da célula. Com peso molecular igual a 64.000, é formada por quatro unidades de heme-globina. Os grupos prostéticos da hemoglobina são os quatro radicais heme. Cada um é composto por um átomo de ferro (íon ferroso) coordenado a quatro anéis pirrólicos, através de seus átomos de nitrogênio. As posições dos anéis pirrólicos são substituídas por oito resíduos: quatro radicais metílicos, dois propionatos e dois vinílicos e os anéis são reunidos entre si por pontes metênicas. O átomo de ferro liga-se a um resíduo de histidina da cadeia globínica. A outra posição de coordenação do ferro fica livre na desoxiemoglobina e ligada ao oxigênio na oxiemoglobina. Cada grupo heme está ligado a uma molécula globínica. Duas das cadeias que participam na formação do tetrâmero possuem 141 aminoácidos cada, e são, denominadas do tipo alfa (alfa e

zeta). As outras duas, com 146 aminoácidos cada, são conhecidas por tipo beta (beta, delta, gama e epsilon) (Fimls, 1989).

O grau de saturação da hemoglobina é geralmente expresso em termos de tensão de oxigênio em que ocorre 50% da saturação, chamada P_{50} . Quando a afinidade do oxigênio está aumentada, a curva de dissociação é deslocada para a esquerda e o valor de P_{50} está reduzido. Ao contrário, quando a afinidade de oxigênio diminui, a curva é deslocada para direita e P_{50} está aumentada (Fimls, 1989).

A hemoglobina é continuamente oxidada, in vivo, do estado ferroso para o férrico, formando metemoglobina. A redução de metemoglobina, na célula normal, é alcançada primariamente através de um sistema ligado ao NADH - dinucleotídeo da nicotinamida - e adenina reduzida, conhecido como metemoglobina redutase (também conhecido como NADH - diaforase ou citocromo b_5 redutase). A NADH - diaforase catalisa um passo da via principal da redução da metemoglobina. Esta enzima reduz o citocromo b_5 , que por sua vez reduz o ferro da metemoglobina da forma trivalente para a forma bivalente. Um nível de metemoglobina equilibrado é alcançado quando a velocidade de formação de metemoglobina é igual à velocidade de sua redução, seja através do sistema NADH - diaforase ou de mecanismos auxiliares como redução química direta por ascorbato ou glutathiona reduzida (Coleman, 1995).

A metemoglobina é a hemoglobina em que o ferro foi oxidado ($\alpha_2^{+3}\beta_2^{+3}$), e não é capaz de ligar-se reversivelmente ao oxigênio; de cor

castanha avermelhada mostra um pico de absorbância a 630 nm, quando em pH ácido (Fimls, 1989).

1.1.3. Metemoglobina

A metemoglobina é encontrada nos eritrócitos em três situações: quando a velocidade de oxidação do heme está aumentada, quando a redução da metemoglobina está limitada pela deficiência hereditária de NADH - metemoglobina redutase ou devido à herança de uma anormalidade estrutural na molécula da globina em que a hemoglobina é estabilizada no estado oxidado (doença da hemoglobina M). A formação da metemoglobina resulta em desnaturação da globina e precipitação de corpos de Heinz. O aumento de hemólise pode ser ocasionada por xenobióticos oxidantes, como as sulfonas, as anilinas e o paraquat entre outros (Fimls, 1989; William et al., 1990).

A metemoglobinemia descreve o estado clínico em que mais de 1% da hemoglobina do sangue foi oxidada a forma férrica. Ocorre decréscimo na capacidade de transporte de oxigênio no sangue, porque o ferro oxidado não se liga reversivelmente ao oxigênio. Entretanto, quando um ou mais átomos de ferro são oxidados, a conformação da hemoglobina é modificada fazendo com que a afinidade do oxigênio aos grupos ferrosos remanescentes seja aumentada. Desta maneira, a

metemoglobinemia exerce um efeito duplo na diminuição do suprimento de oxigênio para os tecidos.

As características clínicas de um quadro significativo de metemoglobinemia incluem cianose, fadiga, taquicardia e em estados agudos severos podem produzir sintomas de anemia. Se os níveis de metemoglobina atingem, agudamente, 60 a 70% do total do pigmento, pode ocorrer colapso vascular, coma e morte (Fimls, 1989; William et al., 1990).

O diagnóstico laboratorial é feito através da quantificação da metemoglobina por métodos espectrofotométricos.

A metemoglobinemia adquirida é consequência de exposição a substâncias químicas e fármacos com potencial oxidante, tais como sulfonas, sulfonamidas, anilina e derivados, nitratos, nitritos, metoclopramida, fenazopiridina, anestésicos locais e azul de metileno em altas doses. Dentre estas, a dapsona é citada como um dos principais fármacos que acarretam metemoglobinemia, na intoxicação aguda e mesmo em doses terapêuticas (Queiroz et al., 1997 e Bucaretschi, 2000).

1.1.4. N-Acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC), fármaco mucolítico utilizado no tratamento da bronquite crônica e outras patologias pulmonares, age através da reação de seu grupamento químico sulfidril com as pontes dissulfeto das secreções mucosas, dissolvendo-as.

A NAC é bem absorvida e rapidamente metabolizada. Sendo assim, somente cerca de 10% da amostra ingerida permanece na circulação por um tempo razoável. A maioria da NAC é consumida na produção de glutathione intracelular, em um extensivo metabolismo de primeira passagem no fígado (Vincenzini et al., 1998).

A avaliação da biodisponibilidade da NAC é bastante difícil e de pouca utilidade, já que o mesmo pode ser considerado um pró-fármaco da cistina, que é rapidamente convertido a cisteína e GSH no fígado. Entretanto, a análise de biodisponibilidade funcional do NAC, por meio da formação de GSH, é muito mais útil. Estudos já demonstraram que a NAC é capaz de retomar os níveis normais de GSH em pacientes portadores de HIV com baixa concentração de GSH no sangue (De Rosa, 2000).

Um dos principais usos da NAC é na intoxicação por paracetamol. O paracetamol é um fármaco seguro, no entanto de estreita margem terapêutica; o dobro ou triplo da dose usual pode causar hepatotoxicidade grave, potencialmente fatal. Também é relatada uma toxicidade renal. Esses efeitos tóxicos ocorrem pela saturação das enzimas hepáticas que catalisam as reações de conjugação normais, fazendo com que o fármaco seja metabolizado pelas oxigenases de função mista. O metabólito reativo resultante, N-acetil-benzoquinoneimina, é inativado por conjugação com a GSH. Porém na depleção dos estoques de GSH, a N-acetil-benzoquinoneimina se

acumula e reage com os componentes nucleofílicos das células. Isto causa necrose no fígado e nos túbulos renais. A NAC, por ser precursora de GSH, na intoxicação por paracetamol, repõe os estoques de GSH (Rang et al., 1997; Alsalim & Fadel, 2003).

Figura 2 – Representação estrutural da N-acetilcisteína

1.1.5. Glutathiona

A glutathiona (GSH – glutathiona reduzida), é um tripeptídeo formado pelos resíduos de glicina, glutamato e cisteína. O primeiro passo na sua síntese é a condensação do grupo γ -carboxila do glutamato com o grupo α -amino da cisteína. O grupo carboxila é ativado primeiro por ATP para formar o intermediário acil-fosfato, o qual é então atacado pelo grupo amino da cisteína. O segundo passo é similar, com o grupo α -carboxila da cisteína ativado formando um acil-fosfato que permite a condensação com a glicina (Lehninger et al., 1995).

A GSH está presente em virtualmente todas as células, em geral em altos níveis e pode ser pensada como um tipo de tampão de redox.

Ela provavelmente ajuda a manter, no estado reduzido, os grupos sulfidrilas das proteínas e o íon ferro do grupo heme no estado ferroso (Fe^{2+}). A sua função redox pode também ser empregada na remoção de peróxidos tóxicos que, sob condições aeróbicas, formam-se no curso do crescimento e no metabolismo (Lehninger et al., 1995).

A glutathiona reduzida tem um papel central em uma grande quantidade de processos bioquímicos, e o distúrbio na sua homeostase implica na etiologia e progresso de um número grande de patologias. A GSH é necessária para uma síntese adequada de proteínas e DNA, regulação do ciclo celular, termotolerância, secreções exócrinas, proteção contra danos oxidativos detoxificação de metais reativos e eletrófilos endógenos e exógenos, biosíntese de ácidos mercaptúricos (N-acetil-L-cisteínas S-substituídos), e armazenamento e transporte de cisteína (DeLeve e Kaplowitz, 1990; Meister, 1984; Meister e Anderson, 1983; Wang e Ballatori, 1998).

A síntese e catabolismo da GSH e seus aductos ocorrem através de uma série de passos que envolvem várias enzimas e transportadores de membrana plasmática, coletivamente denominadas como ciclo γ -glutamil (Meister e Anderson, 1983; Meister e Tate, 1976).

A GSH é sintetizada em todas as células do corpo, mas o fígado é, quantitativamente, o maior sítio de síntese. A GSH é sintetizada no espaço intracelular a partir de seus aminoácidos precursores através da enzima γ -glutamilcisteína sintetase e da GSH sintetase, através de um

processo dependente de ATP (DeLeve e Kaplowitz, 1990; Hahn et al., 1978; Lauteburg et al., 1984).

Dentro da célula, a GSH existe principalmente (>98%), na forma tiol-reduzida (GSH), mas também existe em pequena quantidade na forma tiol-oxidada (GSSG), tioéter, mercaptato e outras formas tio-ésteres (glutathiona-S-conjugados). Após sua síntese, a GSH é liberada para outros compartimentos intracelulares, incluindo a mitocôndria e retículos endoplasmáticos, e também para os espaços extracelulares (por exemplo, plasma sanguíneo e bile) para sua utilização por outras células e tecidos (Ballatori et al., 2004).

Em contraste à síntese de GSH, que ocorre no espaço intracelular, a degradação da GSH ocorre exclusivamente de maneira extracelular, e somente na superfície das células que expressam a ectoenzima γ -glutamil transpeptidase (também conhecida por γ -glutamil transferase ou γ GT) (Ballatori et al., 2004).

A γ GT, que é abundante na superfície apical da maioria das células de tecidos de transporte, incluindo as membranas canaliculares do fígado e ductos biliares, é a única enzima que pode iniciar o catabolismo da GSH, glutathiona-S-conjugados e complexos de glutathiona em condições fisiológicas. Pelo fato desta enzima ser ligada à membrana com seu sítio ativo localizado na matriz extracelular, presume-se que o passo inicial do transporte para o meio extracelular da GSH e de seus aductos é também

o passo regulatório na sua circulação em todas as células dos mamíferos (Ballatori et al., 2004).

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura química da glutathiona. A = Glutathiona Reduzida. B = Glutathiona Oxidada.

Figura 4 – Homeostase da glutatona. Glu = glutamina, Cis = Cisteína, Gli = Glicina, γ -Glu-Cis-Gli = Glutathione Reduzida, GSSG = Glutathione Oxidada, GSH = Glutathione, x = Xenobiótico, GS-x = Complexo Glutathione-Xenobiótico, γ GT = γ -Glutamyl Transferase.

1.1.6. Bilirrubina

Quando os eritrócitos são destruídos no sistema reticuloendotelial no baço, os grupamentos heme também são degradados. A enzima heme oxigenase, na presença de oxigênio molecular e NADPH, abre o anel protoporfirínico, liberando ferro, monóxido de carbono e um tetrapirrol linear denominado biliverdina. O ferro é reciclado para futuras sínteses do grupo heme e o monóxido de carbono é excretado pelos pulmões. A biliverdina passa por mais um passo metabólico (uma

redução de uma dupla ligação no centro da molécula), formando a bilirrubina (Kaplan, 1996).

Figura 5 – Formação da bilirrubina a partir do grupamento heme.

A molécula de bilirrubina consiste de duas partes quase idênticas, ligadas por um grupo $-\text{CH}_2-$ no seu centro. Como este átomo de carbono central é completamente saturado, existe rotação livre entre suas ligações. Isto permite que os grupos polares da molécula formem pontes de hidrogênio internas, e a molécula toma uma conformação espacial que deixa sua parte hidrofóbica voltada para o exterior, o que explica sua baixa solubilidade em soluções aquosas (Kaplan, 1996).

Figura 6 – Representação esquemática da estrutura química da bilirrubina.

Uma vez liberadas no plasma, a bilirrubina se liga à albumina. O transporte da bilirrubina no estado conjugado previne sua entrada em outros tecidos, onde poderia exercer efeitos tóxicos. Algumas drogas, como sulfonamidas, barbituratos e salicilatos competem pelo sítio de ligação da bilirrubina à albumina. Em crianças, que têm uma capacidade menor de ligação à bilirrubina, a bilirrubina pode ser deslocada por essas drogas da albumina, cruzar a barreira hematoencefálica, penetrar nas células nervosas e causar o *kernicterus* (pigmentação dos gânglios da base por bilirrubina) (Kaplan, 1996). Este processo produz um distúrbio desagradável e permanente do movimento, conhecido como coreoatetose, caracterizado por contorções e movimentos circulares na criança (Rang et al., 1997).

Durante a passagem pela microcirculação hepática, a albumina libera a bilirrubina no fígado, que se difunde pelas membranas, onde é

conjugado ao ácido glicurônico, para poder ser excretado junto à bile (Kaplan, 1996).

Em condições patológicas ou em situações onde haja interferência no metabolismo da bilirrubina, a mesma pode se encontrar em concentrações elevadas no soro. A icterícia aparece quando uma concentração acima de 25 mg/L de bilirrubina no soro é alcançada. Por si só, a hiperbilirrubinemia normalmente não é muito danosa à saúde, já que existem mecanismos adequados de conjugação e detoxificação da bilirrubina. Entretanto, a hiperbilirrubinemia indica alguma anormalidade na produção ou metabolismo da bilirrubina (Kaplan, 1996).

1.1.7. Lactato Desidrogenase

A enzima lactato desidrogenase (LDH) está presente em praticamente todos os tecidos, e catalisa a reação de redução do piruvato a lactato utilizando o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD). A LDH tem um peso molecular de cerca de 140 kDa e é um tetrâmero composto de quatro subunidades de peso molecular 35kDa cada (Kaplan, 1996).

Figura 7 – Reação catalisada pela enzima Lactato Desidrogenase (LDH).

A reação catalisada por esta enzima é reversível, mas o equilíbrio está deslocado fortemente para o sentido da formação do ácido L-láctico. A LDH não é específica para o piruvato nem para o lactato. Na reação de redução do piruvato a lactato, a LDH reage com os α -ceto e α , γ -dicetoácidos em geral. Na reação de lactato a piruvato, a LDH reage com os α -hidróxi e γ -hidroxi- α -cetoácidos (Henry, 1980).

A LDH se localiza exclusivamente no citoplasma das células. Por ser uma enzima localizada globalmente nos tecidos, é um indicador não específico de dano celular.

1.1.8. Hemograma

O hemograma é o exame laboratorial de rotina para avaliação quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue. É coadjuvante indispensável na análise de várias patologias, pois sofre alterações conhecidas e reprodutíveis. O hemograma inclui o eritrograma e o leucograma. O eritrograma consiste da contagem de eritrócitos,

dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito, cálculo dos índices eritrocitométricos e da observação microscópica dos eritrócitos.

Essas análises são importantes na detecção de várias patologias que causam alterações sanguíneas e fundamentais na avaliação de doenças hemolíticas intravasculares. O hematócrito associado à contagem de eritrócitos fornece dados sobre a eritropoese, e dados adicionais podem ser avaliados pela dosagem de hemoglobina.

O cálculo dos índices eritrocitométricos é útil na determinação do tipo de anemia que se pretende determinar, correlacionando tamanho, volume e concentração de hemoglobina presente dentro dos eritrócitos. Estes dados, porém, devem ser confirmados pela visualização microscópica e conseqüente análise morfológica dos eritrócitos.

1.1.9. Reticulócitos

O reticulócito é uma célula jovem que representa uma fase intermediária entre os eritroblastos da medula óssea e os eritrócitos maduros, anucleados e já totalmente hemoglobinizados. Por ainda não estarem totalmente maduros, os reticulócitos apresentam-se na periferia como células um pouco maiores que os eritrócitos e com uma coloração azul-acinzentada que se deve à existência de material nuclear residual de cor azulada associada à cor avermelhada da hemoglobina.

O reticulócito sofre um período inicial de maturação dentro da medula óssea e é então liberado ao sangue periférico onde se diferencia em hemácia madura em 2 a 3 dias. Ele é uma célula vermelha anucleada ligeiramente maior do que a hemácia madura (10 a 15 μm versus 6 a 8 μm), e contém resquícios de RNA e outras organelas que podem ser visualizadas com o uso de corantes supravitais do tipo do azul de cresil brilhante. Os reticulócitos “jovens” possuem massas densas de RNA e outras substâncias, que vão se tornando granulares e finalmente desaparecem quando o reticulócito completa a sua diferenciação a eritrócito maduro.

Sua avaliação é importante, pois serve como indicador da produção de eritrócitos pela medula óssea.

As causas mais comuns de reticulocitose são as hemorragias agudas, as anemias hemolíticas agudas e crônicas e a resposta ao tratamento de reposição de ferro, folato e vitamina B12. Uma contagem diminuída de reticulócitos pode ocorrer nas anemias aplásticas, na invasão medular e nas anemias carenciais antes do tratamento.

1.1.10. Haptoglobina

A haptoglobina é uma glicoproteína de fase aguda que se torna aumentada no sangue após doenças agudas ou choque. Esta proteína liga-se à hemoglobina livre, assim facilitando sua remoção pelo sistema

retículoendotelial. Assim, à medida que a hemoglobina é liberada no sangue, é conjugada à haptoglobina, evitando assim uma perda de ferro pelos rins. Deste modo, a haptoglobina sérica está diminuída em casos de hemólise intravascular, como resultado de sua ligação à hemoglobina e subsequente remoção. Assim, em qualquer processo hemolítico não se observa hematúria ou metemalbuminemia até que a concentração de hemoglobina no plasma exceda a capacidade de captação da haptoglobina plasmática. Níveis baixos de haptoglobina são, em geral, indicativos de destruição eritrocitária (Kaplan, 1996; Henry, 1980).

2. OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos “*in vivo*” da administração de N-acetilcisteína sobre a metemoglobinemia induzida por dapsona, em ratos Wistar.
- Analisar parâmetros bioquímicos (bilirrubinas, lactato desidrogenase e glutatona) e hematológicos (hemograma completo, reticulócitos, fragilidade osmótica e haptoglobina), quando se realiza a associação entre N-acetilcisteína e dapsona.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados grupos (n=8) de ratos *Wistar*, machos, adultos, com peso variando entre 200 a 220 gramas, obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico medindo 50 x 35 x 15 cm. As gaiolas foram mantidas em salas com temperatura ambiente constante (22 a 24°C), controlada por meio de aparelho de ar condicionado, em ciclo controlado de 12 horas de claro e escuro. Água e ração foram fornecidas “*ad libitum*” durante todo o experimento.

3.2. Via de Administração dos Fármacos e Regime de Dosagem

Regime de dosagem: dose única

Grupo I: 200 µL de solução salina (SS), administrada por via peritoneal.

Grupo II: 200 µL de DMSO, administrado por via peritoneal.

Grupo III: 200 µL de uma solução de dapsona (40 mg/kg) em dimetilsulfóxido (DMSO), administrada por via peritoneal.

Grupo IV: 200 µL de uma solução de N-acetilcisteína (75 mg/kg), em DMSO, administrada por via peritoneal.

Grupo V: 200 μ L de uma solução de dapsona (40 mg/kg) e de N-acetilcisteína (75 mg/kg), em DMSO, administrada por via peritoneal.

Grupo VI: 200 μ L de uma solução de N-acetilcisteína (75mg/kg), em DMSO, administrada uma hora antes de 200 μ L de uma solução de dapsona (40mg/kg), em DMSO, administradas por via peritoneal.

3.3. Coleta de Material

Para a realização da coleta de sangue, os ratos foram anestesiados com éter etílico, após duas horas da administração dos fármacos, determinado nos estudos de dose, segundo o tempo de meia-vida da dapsona.

O sangue de cada animal foi colhido da artéria aorta, com seringa plástica e agulha 25 x 0,8mm, e logo após, distribuído em três tubos:

- tubo 1 (com 50 μ L de heparina): 1,5 mL de sangue adicionados para a dosagem de metemoglobina e glutathione;
- tubo 2 (com 25 μ L de EDTA dissódico): 1,5 mL de sangue adicionados para as análises hematológicas (hemograma completo, hematócrito, contagem de reticulócitos e fragilidade osmótica)
- tubo 3 (sem anticoagulante): cerca de 3,0 mL de sangue adicionados para separação do soro e realização das análises bioquímicas (bilirrubinas, lactato desidrogenase e haptoglobinas).

3.4. Preparo das Amostras

3.4.1. Sangue com Heparina (tubo 1)

Uma alíquota de 200 μL foi utilizada para determinar a concentração de metemoglobina. Outra alíquota de 200 μL foi utilizada para se determinar a concentração da glutathione eritrocitária.

3.4.2. Sangue com EDTA (tubo 2)

Logo depois de colhido, o sangue foi levado ao laboratório para que as análises hematológicas fossem realizadas. Após a realização dos testes, o volume de sangue restante foi desprezado.

3.4.3. Sangue sem Anticoagulante (tubo 3)

A amostra de sangue sem anticoagulante foi tratada para a separação do soro, sendo que o tempo para retração do coágulo em banho-maria a 37°C foi de 2 horas. Depois desse tempo, o coágulo retraído foi retirado do tubo, e o restante foi centrifugado a 2000 RPM por 15 minutos, para sedimentação da parte vermelha. O soro retirado foi então distribuído em duas amostras (aproximadamente 600 μL cada). Uma das amostras foi encaminhada para as análises bioquímicas

(bilirrubinas e lactato desidrogenase) e a outra amostra foi encaminhada para a análise das haptoglobinas.

3.5. Análise da Metemoglobina por Espectrofotometria

3.5.1. Método de Evelyn & Malloy (mod. Harrison & Jollow, 1992)

Foi utilizado espectrofotômetro E-225 D-CELM-205 S.

- Material:

KCN 10%, $K_3Fe(CN)_6$ a 20%, tampão fosfato 0,02 M pH 7,8 com 0,05 % de Triton x-100.

- Método Analítico:

A 200 μ L de sangue heparinizado foram adicionados 10 mL de tampão fosfato com triton X-100, seguido de agitação por 30 segundos em agitador tipo mixer para ocorrer a hemólise do sangue. A solução hemolisada foi dividida em quatro tubos numerados de 1 a 4. O tubo 1 permaneceu somente com o sangue hemolisado, nos tubos 2 e 4 foram adicionados de 50 μ L de KCN a 10 % e nos tubos 3 e 4, 50 μ L de $K_3Fe(CN)_6$.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 635 nm. O cálculo da concentração de metemoglobina é realizado pela fórmula a seguir:

$$\% \text{Metemoglobina} = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \right) \times 100$$

3.6. Determinação da Glutathiona Eritrocitária

3.6.1. Método de Beutler, Duron e Kelly (1963)

Foi utilizado espectrofotômetro E-225 D-CELM-205 S.

- Material:

- Solução de Precipitação:

Ácido metafosfórico (1,67g), EDTA dissódico (0,2g), NaCl (30g) e Água destilada (qsp 100mL).

- Solução Fosfato:

Na₂HPO₄ (0,3M) em água destilada.

- Reagente DTNB:

5,5' ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (40mg) em 100mL de citrato de sódio a 1%.

- Método Analítico:

A 0,2mL do sangue advindo do tubo 1 (com heparina) foram adicionados 1,8mL de água destilada e 3mL da solução de precipitação. A suspensão resultante foi filtrada e o precipitado foi desprezado. A 2mL do filtrado foram adicionados 8mL da solução fosfato, e 1mL do reagente DTNB. Realizou-se então a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro operando a 412nm. Como branco utilizou-se uma solução composta de 8mL de solução fosfato e 2mL da solução de precipitação diluída (3:2 em H₂O), além de 1mL do reagente DTNB. O valor de glutathiona presente nos eritrócitos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$Glutathiona (mg \%) = 310,4 \times D.O.$$

3.7. Provas Bioquímicas

3.7.1. Bilirrubinas

O método utilizado foi o desenvolvido em 1958 por Sims & Horn. A bilirrubina foi determinada por diazotização e doseamento do corante azóico, que tem absorção máxima em 525 nm. Quando se mistura ácido sulfanílico em meio ácido e nitrito de sódio, forma-se ácido nitroso (instável). O ácido sulfanílico e a bilirrubina na presença do ácido nitroso sofrem uma reação de diazo que resulta num composto colorido que é a azobilirrubina. A quantidade de azobilirrubina formada é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina no soro. A bilirrubina direta (conjugada com ácido glicurônico) foi dosada em meio aquoso, enquanto que a bilirrubina total foi dosada na presença de benzoato de sódio.

- Material:

- Acelerador:

Benzoato de sódio (260mmol/L), cafeína (130mmol/L) e acetato de sódio (460 mmol/L);

- Ácido Sulfanílico 0,1% (v/v);

- Nitrato de sódio 0,5% (v/v);

- Diazo reagente (preparado na hora do uso):

Nitrito de sódio 0,5% (uma gota) e ácido sulfanílico (1,5 mL)

- Solução padrão de bilirrubina 10 mg/dL

- Método Analítico:

Procedeu-se da seguinte maneira em 3 tubos de ensaio:

	Branco	Bilirrubina direta	Bilirrubina total
Água destilada	4,5 mL	4,5 mL	-
Acelerador	-	-	4,5 mL
Ácido sulfanílico	0,5 mL	-	-
Diazo reagente	-	0,5 mL	0,5 mL
Misturou-se bem até as soluções apresentarem-se límpidas			
Soro	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL

Após misturar bem, os tubos foram colocados em repouso à temperatura ambiente durante 5 minutos. As absorbâncias das bilirrubinas direta e total foram determinadas em 525 nm, acertando o zero com o branco.

3.7.2. Lactato Desidrogenase

A enzima lactato desidrogenase (ou desidrogenase láctica - LDH) está presente em grande quantidade dentro dos eritrócitos, e normalmente resulta aumentada em casos de anemia hemolítica. É um marcador não específico, porém, por existir em todos os tecidos é capaz de sinalizar uma série de outras alterações. É, entretanto, um indicador interessante se analisado em concomitância a outros parâmetros.

- Material:

Kit Labtest Diagnóstica para determinação da Desidrogenase Láctica (LDH) em amostras de soro, com método cinético de tempo fixo e medição de ponto final, contendo:

Tampão (200 mmol/L) pH 8,2, substrato (tampão 200 mmol/L + ácido láctico 260 mmol/L, padrão (150 U/l), reagente de cor (INT 4 mmol/L, NAD 7,5 mmol/L e fenazina 1,6 mmol/L) e estabilizador (ácido clorídrico 200 mmol/L). Todos os reagentes, com exceção do estabilizador e do padrão, contêm como conservante azida sódica (0,05 g/dL).

- Método Analítico:

Procedeu-se da seguinte maneira em 3 tubos de ensaio:

	Controle	Teste	Padrão
Tampão	1,0 mL	-	1,0 mL
Substrato	-	1,0 mL	-
Amostra	0,05 mL	0,05 mL	-
Padrão	-	-	0,05 mL

Colocou-se em banho-maria 37°C por 2 minutos.

Reagente de cor	0,2 mL	0,2 mL	-
-----------------	--------	--------	---

Misturou-se e colocou-se em banho-maria 37°C por exatos 5 minutos.

Estabilizador	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
---------------	--------	--------	--------

Misturou-se novamente e deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 5 minutos. As absorbâncias do controle, do teste e do padrão foram determinadas em 500 nm.

Para o cálculo, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da Desidrogenase Láctica (U / L)} = \frac{\text{Abs Teste} - \text{Abs Controle}}{\text{Abs Padrão}} \times 150$$

3.8. Provas Hematológicas

3.8.1. Contagem de Eritrócitos

A contagem de glóbulos consiste em diluir o sangue em uma proporção exata (1:200), em diluente específico (Hayem) e examinar em microscópio, por meio de câmaras especiais, uma pequena quantidade da amostra.

Contam-se as células e calcula-se o número destas por volume de sangue.

- Material:

- Câmara de contagem ou hemocitômetro do tipo Neubauer;

- Microscópio;

- Solução diluente (líquido de Hayem):

Bicloreto de mercúrio (0,25g), cloreto de sódio (0,5g), sulfato de sódio (2,5g) e água destilada (qsp 100mL).

- Método Analítico:

Adiciona-se em um tubo 380 μL do diluente e 20 μL da amostra, chegando-se assim a uma diluição 1:200. Homogeneizou-se e preencheu-se a área reticulada da câmara. Após três minutos de espera para sedimentação, realizou-se a contagem em microscópio com aumento de 400x. Realizou-se a contagem no retículo central da câmara, em 5 pequenos quadrados, e aplicou-se a fórmula para a determinação do número de eritrócitos por mm^3 de sangue:

$$N^{\circ} \text{ de eritrócitos/mm}^3 = n^{\circ} \text{ de glóbulos contados} \times 10.000.$$

3.8.2. Determinação do Hematócrito

O hematócrito é o volume que os eritrócitos empacotados ocupam em um dado volume de sangue. Sua determinação consiste na centrifugação do sangue, medindo-se a percentagem de glóbulos vermelhos na coluna sanguínea obtida.

- Material:

Tubos capilares de diâmetro uniforme e centrífuga para microhematócrito.

- Método Analítico:

Preencheu-se um capilar simples com sangue colhido com anticoagulante por uma das extremidades até que faltou um centímetro para encher o capilar. Fechou-se a extremidade vazia do tubo fundindo o vidro com calor (bico de gás) evitando atingir a coluna de sangue. Colocou-se na centrífuga, com a extremidade fechada voltada para o círculo externo e centrifugou-se a 11.000 rpm durante 5 minutos. A leitura foi realizada em um gráfico próprio e a percentagem da coluna de glóbulos vermelhos pôde ser aferida.

3.8.3. Índices Eritrocitométricos

Conhecendo o número de eritrócitos, a quantidade de hemoglobina e o valor do hematócrito, podemos calcular os índices eritrocitométricos.

Esses índices são úteis para caracterizar os tipos de anemia, porém devem ser complementados como o estudo morfológico dos eritrócitos para o diagnóstico definitivo.

3.8.3.1. Volume Corpuscular Médio (VCM)

Indica o tamanho médio dos eritrócitos. É calculado a partir dos números obtidos na contagem dos eritrócitos. É a relação entre o hematócrito e o número de eritrócitos.

$$VCM = \frac{Ht(L/L) \times 1000}{He(10^{12}/L)}$$

3.8.3.2. Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

É a quantidade de hemoglobina contida em um eritrócito. É a relação entre o valor encontrado da hemoglobina em g/L e o número de eritrócitos por litro de sangue.

$$HCM = \frac{Hb(g/L)}{He(10^{12}/L)}$$

3.8.3.3. Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

É a concentração da hemoglobina encontrada em cada eritrócito. O resultado é expresso em gramas de hemoglobina por dL de eritrócitos empacotados.

$$CHCM = \frac{Hb(g/dL)}{Ht(L/L)}$$

3.8.4. Coloração das Extensões Sangüíneas

A coloração de rotina das extensões de sangue é feita com corantes especiais, baseados na mistura de Romanowsky (eosina, azul e azures de metileno). Este pesquisador observou que soluções envelhecidas de azul de metileno coravam em púrpura os núcleos dos leucócitos.

Usamos o corante de May-Grunwald, que dá uma diferenciação celular muito boa, permitindo um bom estudo citológico. A extensão sanguínea corada presta-se a realização da contagem diferencial de leucócitos e ao estudo morfológico dos eritrócitos.

- Material:

Lâminas de vidro e corante May-Grunwald.

- Procedimento para coloração:

O material (sangue) foi distendido sobre lâmina de vidro e seco ao ar. Colocou-se o corante sobre as extensões até cobri-las completamente e deixou-se em repouso por 3 minutos (tempo de fixação). Adicionou-se sobre o corante a mesma quantidade de água destilada de pH neutro e novamente um repouso, de 14 minutos (fase de coloração). Lavou-se a lâmina com água corrente, e secou-se à temperatura ambiente. Prosseguiu-se então a observação microscópica.

3.8.5. Contagem de Reticulócitos

O reticulócito é o último estágio de eritrócito imaturo e ainda contém RNA citoplasmático remanescente.

A visualização dos reticulócitos se faz pela coloração deste RNA residual com corantes supravitais (azul de cresil brilhante). Coloração supravital é aquela realizada após a morte somática e antes da morte molecular da célula. A contagem de reticulócitos é um meio simples de avaliar a velocidade de produção de células vermelhas, ou seja, a atividade eritropoética da medula óssea.

Como a porcentagem de reticulócitos está intimamente ligada ao hematócrito, esta pode estar falsamente elevada devido ao sangue total conter poucos eritrócitos.

Um fator de correção é usado, portanto, considerando um hematócrito médio normal (grupo salina).

- Material:

- Tubos de ensaio 11 x 75 mm;

- Lâminas de vidro;

- Microscópio;

- Solução Corante:

Azul cresil brilhante (1g) e solução fisiológica 0,9% (100mL)

-Método Analítico:

Colocou-se 2 gotas de sangue e 2 gotas da solução corante em um tubo de ensaio 11x75 mm. Misturou-se e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Após este tempo, realizou-se o esfregaço na lâmina e deixou-se secar. Examinou-se então em objetiva de imersão, em óleo. Contou-se em 1000 eritrócitos quantos continham grânulos ou retículos. A partir do número absoluto de eritrócitos pôde-se calcular o número de reticulócitos por mm^3 , através da seguinte fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de reticulócitos} / \text{mm}^3 = \frac{\% \text{ de reticulócitos} \times n^{\circ} \text{ de eritrócitos} / \text{mm}^3}{100}$$

A fórmula para correção da contagem de reticulócitos em função de seu hematócrito é:

$$\text{reticulócito corrigido} = \text{reticulócitos} (\%) \times \left(\frac{\text{hematócrito} (L / L)}{\text{hematócrito grupo salina}} \right)$$

3.8.6. Fragilidade Osmótica

Este teste é uma maneira simplificada de estimar a relação área superficial / volume dos eritrócitos. O teste determina a resistência dos eritrócitos à hemólise em várias concentrações de soluções salinas hipotônicas.

- Material:

- Solução salina tamponada 10% pH 7,4 (solução estoque):

NaCl (90g), Na_2HPO_4 anidro (13,65g), NaH_2PO_4 anidro (1,87g)

e água destilada (qsp 1L).

- Solução Salina trabalho 1% (Diluição 1:10 da solução estoque);
- Espectrofotômetro;
- Centrífuga.
- Método Analítico:

Foram realizadas diluições seriadas da solução salina trabalho, conforme a tabela abaixo:

Tubo	Solução salina trabalho (mL)	água destilada (mL)	Diluição final (%)
1	-	10,0	0
3	2,0	8,0	0,20
5	3,0	7,0	0,30
7	4,0	6,0	0,40
8	4,5	5,5	0,45
9	5,0	5,0	0,50
10	5,5	4,5	0,55
12	6,5	3,5	0,65
13	7,5	2,5	0,75
14	8,5	1,5	0,85

Tabela 1 – Diluições seriadas da solução salina trabalho utilizada para o teste de fragilidade osmótica.

A cada tubo foi acrescentado 0,1mL de sangue, misturado por inversão e deixado em repouso em temperatura ambiente por 2 horas. Depois de decorrido esse tempo, os tubos foram remisturados e centrifugados por 5 minutos a 2000 RPM. Os sobrenadantes foram lidos a 540 nm, usando a solução salina 0,85% (tubo 14) como branco e o tubo com água destilada (tubo 1) como padrão de 100% de lise. O grau de hemólise de cada tubo foi calculado pela fórmula:

$$\text{Grau de hemólise(\%)} = \frac{D.O. \text{ diluição teste}}{D.O. \text{ padrão (tubo 1)}} \times 100$$

3.8.7. Haptoglobina

A haptoglobina fixa a hemoglobina secretada na lise de eritrócitos. O complexo haptoglobina / hemoglobina é eliminado rapidamente da circulação. Uma secreção de hemoglobina aumentada por hemólise intravascular leva a uma queda da concentração de haptoglobina e, em hemólises graves, mesmo ao seu completo consumo.

- Material:

Kit Dade Behring de antisoro contra haptoglobina humana, contendo:

Antisoro contra haptoglobina humana, padrão de haptoglobina, controle de haptoglobina, tampão de reação e diluente.

- Metodologia Analítica:

A haptoglobina contida no soro forma imunocomplexos em uma reação imunoquímica com anticorpos específicos que dispersam a luz irradiada. A intensidade da luz difundida depende da concentração da concentração da haptoglobina na amostra. A avaliação se faz por comparação a um padrão de concentração conhecida.

3.9. Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através do programa GraphPad InStat® sendo que o teste de variância (ANOVA) utilizado foi o de comparação múltipla “Tukey-Kramer”. O valor de p assumido para indicar diferença significativa entre os grupos foi de, pelo menos, $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da Metemoglobina por Espectrofotometria

		Metemoglobina (%)					
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	0,30	0,95	5,36	0,79	8,40	14,58
	2	0,26	0,91	6,13	0,66	10,92	14,15
	3	0,22	1,23	5,18	0,96	9,91	16,10
	4	0,31	0,58	5,70	0,33	11,31	13,98
	5	0,34	0,89	4,73	1,17	7,09	16,67
	6	0,31	1,25	6,15	0,64	7,58	15,54
	7	0,34	1,01	7,07	0,93	8,98	14,88
	8	0,29	0,62	6,40	0,32	9,87	12,95
	Média	0,30	0,93	5,84	0,73	9,26	14,86
	Desvio Padrão	0,04	0,24	0,75	0,30	1,52	1,21

Tabela 2 – Metemoglobina. Os valores obtidos significam a porcentagem (%) de metemoglobina presente em cada animal, em relação ao teor de hemoglobina total. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Metemoglobina (%)

Figura 8 – Metemoglobina (%). O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo da porcentagem (%) de metemoglobina presentes nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,001$).

Os grupos apresentam variações muito significantes ($p < 0,001$), sendo que os grupos “DDS 40mg/kg”, “DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas” e “DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg 1h antes” demonstraram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.2. Determinação da Glutationa Eritrocitária

		Glutationa Eritrocitária (mg%)					
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	8,69	9,62	8,07	11,48	11,48	10,86
	2	10,55	9,62	9,31	12,42	8,38	11,17
	3	10,24	8,07	9,62	10,24	10,55	7,76
	4	9,93	9,62	7,76	11,48	9,62	9,93
	5	7,45	7,14	7,14	8,38	9,93	9,62
	6	10,24	7,14	7,76	9,00	9,31	10,86
	7	9,80	8,50	7,90	9,62	9,00	7,76
	8	10,10	8,50	7,50	10,50	10,24	9,90
	Média	9,63	8,53	8,13	10,39	9,82	9,73
	Desvio Padrão	1,04	1,05	0,87	1,37	0,97	1,34

Tabela 3 – Glutationa Eritrocitária. Os valores obtidos indicam o conteúdo de glutatona nos eritrócitos em mg%. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Glutationa Eritrocitaria

(mg% de glutaciona)

Figura 9 – Glutationa Eritrocitária. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo do conteúdo eritrocitário em mg% de glutaciona presentes nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma pequena variação entre os grupos. Os grupos DDS 40mg/kg e NAC 75mg/kg apresentaram uma variação significativa em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.3. Bilirrubinas

4.3.1. Bilirrubina Total

		Bilirrubina Total (mg/dL)					
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	0,232	0,250	0,288	0,432	0,418	0,450
	2	0,332	0,320	0,276	0,336	0,452	0,428
	3	0,384	0,295	0,308	0,372	0,328	0,316
	4	0,324	0,239	0,256	0,404	0,312	0,303
	5	0,232	0,260	0,252	0,322	0,400	0,360
	6	0,336	0,284	0,360	0,376	0,372	0,412
	7	0,272	0,370	0,300	0,396	0,480	0,390
	8	0,352	0,183	0,368	0,385	0,395	0,420
	Média	0,308	0,275	0,301	0,377	0,395	0,385
	Desvio Padrão	0,056	0,056	0,043	0,038	0,057	0,054

Tabela 4 – Dosagem da Bilirrubina Total. Os valores obtidos indicam a concentração de bilirrubina contida no soro dos animais, em miligramas por decilitro (mg/dL). A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Figura 10 – Bilirrubina Total. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo da concentração de bilirrubina, em mg/dL, presente nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma variação entre os grupos. Os grupos NAC 75mg/kg, DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas e DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg 1 hora antes apresentaram uma variação significativa em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana na maioria dos tratamentos, demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.3.2. Bilirrubina Direta

		Bilirrubina Direta (mg/dL)					
		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
Animais	1	0,040	0,040	0,032	0,060	0,040	0,056
	2	0,058	0,089	0,032	0,036	0,036	0,068
	3	0,065	0,043	0,080	0,056	0,018	0,028
	4	0,068	0,043	0,040	0,012	0,016	0,076
	5	0,024	0,080	0,056	0,040	0,026	0,044
	6	0,056	0,077	0,060	0,052	0,019	0,056
	7	0,028	0,071	0,064	0,025	0,038	0,048
	8	0,068	0,045	0,084	0,048	0,029	0,050
Média		0,051	0,061	0,056	0,041	0,028	0,053
Desvio Padrão		0,018	0,020	0,020	0,016	0,009	0,015

Tabela 5 – Dosagem da Bilirrubina Total. Os valores obtidos indicam a concentração de bilirrubina conjugada ao ácido glicurônico (solúvel) contida no soro dos animais, em miligramas por decilitro (mg/dL). A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Bilirrubina Direta

(Concentração Sérica (mg/dL))

Figura 11 – Bilirrubina Direta. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo da concentração de bilirrubina conjugada (solúvel), em mg/dL, presente nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfoxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma variação mínima entre os grupos. O único grupo que apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle (salina), foi o grupo DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas. A baixa variação entre média e mediana na maioria dos tratamentos, demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.3.3. Bilirrubina Indireta

		Bilirrubina Indireta (mg/dL)					
		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
Animais	1	0,192	0,210	0,256	0,372	0,378	0,394
	2	0,274	0,231	0,244	0,300	0,416	0,360
	3	0,319	0,252	0,228	0,316	0,310	0,288
	4	0,256	0,196	0,216	0,392	0,296	0,227
	5	0,208	0,180	0,196	0,272	0,372	0,316
	6	0,280	0,207	0,300	0,324	0,353	0,356
	7	0,244	0,299	0,236	0,371	0,442	0,342
	8	0,284	0,138	0,284	0,337	0,366	0,370
Média		0,257	0,214	0,245	0,336	0,367	0,331
Desvio Padrão		0,042	0,048	0,034	0,041	0,049	0,054

Tabela 6 – Determinação da Bilirrubina Indireta. Os valores obtidos indicam a concentração de bilirrubina não conjugada ao ácido glicurônico (insolúvel em água) contida no soro dos animais, em miligramas por decilitro (mg/dL). A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Bilirrubina Indireta

(Concentração Sérica (mg/dL))

Figura 12 – Bilirrubina Indireta. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo da concentração de bilirrubina não conjugada (insolúvel em água), em mg/dL, presente nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma variação significativa entre os grupos. Os grupos que apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (salina), foram os grupos NAC 75mg/kg, DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas e DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg 1h antes. A baixa variação entre média e mediana na maioria dos tratamentos, demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.4. Lactato Desidrogenase

Atividade da Lactato Desidrogenase Sérica (U/L)							
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	1327,45	2017,66	1246,00	1798,73	1659,33	1651,24
	2	1474,45	2184,26	1043,99	1549,73	1977,80	1733,84
	3	1147,18	1751,64	1065,48	1710,82	1638,96	2351,21
	4	1321,94	1666,52	977,71	2237,63	2181,96	1761,82
	5	1219,73	1701,17	1154,64	1733,64	1930,10	1581,12
	6	1153,03	2189,22	1211,29	1754,64	1526,08	1547,04
	7	1016,22	2538,05	1332,61	1684,17	1898,32	1652,32
	8	1150,00	1780,36	1163,64	1790,25	1875,35	1698,36
	Média	1226,25	1978,61	1149,42	1782,45	1835,99	1747,12
	Desvio Padrão	142,72	308,53	116,24	199,86	213,87	254,52

Tabela 7 – Atividade da Desidrogenase Láctica Sérica (LDH). Os valores obtidos indicam a atividade da enzima LDH contida no soro dos animais, em Unidades Internacionais / Litro (U/L). A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Lactato Desidrogenase (LDH)

(Atividade (U/L))

Figura 13 – Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH) Sérica. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo da atividade enzimática, em U/L, nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma variação significativa entre os grupos. Os grupos que apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (salina), foram os grupos DMSO, NAC 75mg/kg, DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas e DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg 1h antes. A baixa variação entre média e mediana na maioria dos tratamentos, demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.5. Contagem de Eritrócitos

		Contagem Global de Eritrócitos ($\times 10^{12}/L$)					
		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
Animais	1	5,0	5,0	5,6	5,1	5,3	5,5
	2	4,8	5,1	5,0	5,5	4,4	5,6
	3	4,6	5,4	5,0	5,3	5,0	6,3
	4	4,7	5,8	5,3	5,1	5,0	6,1
	5	4,7	4,9	4,9	5,5	5,6	4,8
	6	4,5	5,1	4,8	4,8	6,3	5,3
	7	4,6	5,1	5,2	4,9	5,8	5,4
	8	4,4	5,6	5,0	5,6	6,1	5,8
Média		4,7	5,3	5,1	5,2	5,4	5,6
Desvio Padrão		0,18	0,32	0,26	0,30	0,63	0,47

Tabela 8 – Contagem Global de Eritrócitos. Os valores obtidos indicam o número de eritrócitos ($\times 10^{12}$) por litro de sangue. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Contagem Global de Eritrocitos

(Número de eritrócitos $\times 10E+12/L$)

Figura 14 – Contagem global de eritrócitos. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo da contagem de eritrócitos por litro de sangue, nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma pequena variação entre os grupos. Os grupos DMSO, DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas e DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg 1h antes apresentaram uma certa variação em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.6. Determinação do Hematócrito

Determinação do Hematócrito (L/L)							
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	39	43	43	45	40	40
	2	40	44	40	46	41	39
	3	38	45	42	44	42	41
	4	40	44	44	44	42	38
	5	38	41	40	44	40	39
	6	39	42	40	43	46	39
	7	40	43	42	44	41	42
	8	38	46	42	42	41	39
	Média	39	43,5	41,6	44	41	39,6
	Desvio Padrão	0,93	1,60	1,51	1,20	1,92	1,30

Tabela 9 – Determinação do Hematócrito. Os valores obtidos indicam o volume (em litros) de eritrócitos empacotados por litro de sangue. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Hematócrito

(Valor do hematócrito (L/L))

Figura 15 – Determinação do Hematócrito. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo da contagem de eritrócitos por litro de sangue, nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma pequena variação entre os grupos. Os grupos DMSO, DDS 40mg/kg, NAC 75mg/kg e DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas apresentaram uma certa variação em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.7. Hemoglobina

Determinação da Hemoglobina (g/dL)							
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	11,8	12,2	12,7	14,0	12,1	12,3
	2	11,8	13,0	11,8	13,6	12,6	11,7
	3	10,8	13,9	12,5	12,0	12,2	12,4
	4	11,5	14,4	13,1	14,0	13,5	11,2
	5	11,2	12,7	11,9	13,1	11,8	11,2
	6	12,5	12,0	11,9	12,5	13,6	11,5
	7	11,7	12,4	12,1	12,8	12,3	12,5
	8	11,8	13,4	12,0	12,0	12,0	12,7
	Média	11,6	13,0	12,3	13,0	12,5	11,9
	Desvio Padrão	0,50	0,85	0,47	0,82	0,68	0,61

Tabela 10 – Determinação da Hemoglobina. Os valores obtidos indicam a concentração em g/dL de hemoglobina nas amostras analisadas. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Hemoglobina

(Concentração g/dL)

Figura 16 – Determinação da Hemoglobina. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo da concentração de hemoglobina, em g/dL, nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma pequena variação entre os grupos. Os grupos DMSO e NAC 75mg/kg apresentaram uma certa variação em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.8. Índices Eritrocitométricos

4.8.1. Volume Corpuscular Médio (VCM)

Volume Corpuscular Médio (VCM) (fL)							
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	78,0	86,0	76,8	89,1	75,5	72,7
	2	83,3	86,3	80,0	84,4	70,2	69,6
	3	82,6	83,3	84,0	80,0	84,0	65,1
	4	85,1	82,8	83,0	90,2	64,3	72,2
	5	80,9	83,7	81,6	80,0	73,0	81,3
	6	86,7	82,4	83,3	90,5	70,7	73,6
	7	87,0	84,3	80,8	89,8	67,2	77,8
	8	86,4	82,1	81,0	86,3	84,0	74,1
	Média	83,75	83,86	81,31	86,29	73,61	73,30
	Desvio Padrão	3,18	1,58	2,29	4,41	7,25	4,89

Tabela 11 – Volume Corpuscular Médio (VCM). Os valores obtidos indicam o VCM em femtolitros (fL), calculado para os diversos grupos. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Volume Corpuscular Medio

Figura 17 – Volume Corpuscular Médio (VCM). O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo do cálculo do VCM, em fL, nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma variação entre os grupos. Os grupos DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas e DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg 1h antes apresentaram uma certa variação em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.8.2. Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (pg)							
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	23,6	24,4	22,7	23,2	22,8	22,3
	2	24,7	25,5	23,5	24,9	28,6	20,8
	3	23,4	25,7	25,0	22,9	24,4	19,6
	4	24,4	24,8	24,7	27,4	27,1	20,1
	5	23,7	23,7	24,2	23,9	21,0	23,4
	6	27,8	23,5	24,7	26,3	21,5	21,6
	7	25,5	25,9	23,3	26,1	21,2	23,1
	8	26,8	23,9	24,3	21,5	21,7	22,0
	Média	24,99	24,68	24,05	24,53	23,54	21,61
	Desvio Padrão	1,60	0,95	0,80	2,00	2,90	1,36

Tabela 12 – Hemoglobina Corpuscular Média (HCM). Os valores obtidos indicam o HCM em picogramas (pg), calculado para os diversos grupos. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Hemoglobina Corpuscular Média

Figura 18 – Hemoglobina Corpuscular Média (HCM). O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo do cálculo da HCM, em pg, nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma pequena variação entre os grupos. O grupo DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg 1h antes apresentou uma certa variação em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana, na maioria dos tratamentos, demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.8.3. Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) (g/dL)							
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	30,3	28,4	29,6	31,1	30,1	30,7
	2	29,6	29,5	29,4	29,5	30,6	29,9
	3	28,3	28,7	29,8	28,6	29,0	30,2
	4	28,7	30,0	29,7	30,3	32,2	29,6
	5	29,4	28,3	29,7	29,8	32,7	28,8
	6	32,1	28,6	29,7	29,0	29,5	29,4
	7	29,3	29,8	28,8	29,1	30,0	29,8
	8	31,1	29,0	28,9	28,7	29,3	29,6
	Média	29,85	29,04	29,45	29,51	30,43	29,75
	Desvio Padrão	1,26	0,65	0,39	0,86	1,35	0,56

Tabela 13 – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Os valores obtidos indicam o CHCM em g/dL, calculado para os diversos grupos. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

Figura 19 – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo do cálculo da CHCM, em g/dL, nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfoxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer.

Os resultados não apontam nenhuma diferença estatística entre os grupos. A baixa variação entre média e mediana, na maioria dos tratamentos, demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.9. Contagem de Reticulócitos

Contagem Corrigida de Reticulócitos (%)							
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	2,40	2,54	1,76	2,08	3,08	2,97
	2	1,74	2,59	1,85	3,89	2,73	1,20
	3	1,95	2,54	2,26	2,71	3,12	2,94
	4	1,64	2,03	2,59	2,48	1,72	2,05
	5	1,46	3,36	2,77	3,50	2,87	2,10
	6	1,90	2,05	2,67	3,31	2,01	3,00
	7	1,54	3,09	2,26	2,71	2,31	2,05
	8	1,56	3,42	2,26	1,94	3,15	1,20
	Média	1,77	2,70	2,30	2,83	2,62	2,19
	Desvio Padrão	0,31	0,54	0,37	0,69	0,55	0,74

Tabela 14 – Contagem Corrigida de Reticulócitos. Os valores obtidos indicam a porcentagem de reticulócitos encontrados em relação ao total de eritrócitos, dividido pelo hematócrito médio do grupo salina. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Contagem de Reticulócitos Corrigida

Figura 20 – Contagem de Reticulócitos Corrigida. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo da contagem de reticulócitos em relação (%) ao total de eritrócitos, corrigida pelo hematócrito médio do grupo controle (salina), nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfoxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma variação entre os grupos. Os grupos DMSO, NAC 75mg/kg e DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas apresentaram uma certa variação em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana, na maioria dos tratamentos, demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

4.10. Coloração das Extensões Sangüíneas

Figura 21 – Coloração das Extensões Sangüíneas. A = Grupo “Salina”, B = Grupo “DMSO”, C = Grupo “Dapsona 40 mg/kg”, D = Grupo “N-acetilcisteína 75 mg/kg + dapsona 40 mg/kg juntas”. EB = Eritroblasto, C.A. = Célula em Alvo, ES = Estomatócito, DC = Dacriócito. Aumento de 100x (imersão). Coloração de May-Grunwald.

Figura 22 – Coloração das Extensões Sangüneas – Reticulócitos. A = Grupo “Salina”, B = Grupo “NAC 75 mg/kg”, C = Grupo “N-acetilcisteína 75 mg/kg + dapsona 40 mg/kg juntas”. Ret = Reticulócito. Aumento de 100x (imersão). Coloração azul de cresil brilhante.

4.11. Fragilidade Osmótica

Figura 23 – Fragilidade Osmótica. O gráfico apresenta as curvas de hemólise apresentadas mediante determinada diluição da solução salina, nos diversos grupos. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg.

4.12. Haptoglobina

		Haptoglobinas (g/L)					
Animais		Salina	DMSO	DDS 40mg/kg	NAC 75mg/kg	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg juntas	DDS40mg/kg + NAC75mg/kg 1h antes
	1	0,121	0,120	0,151	0,109	0,110	0,108
	2	0,177	0,150	0,132	0,100	0,100	0,076
	3	0,147	0,120	0,164	0,117	0,100	0,080
	4	0,136	0,136	0,146	0,055	0,115	0,120
	5	0,167	0,152	0,138	0,098	0,089	0,108
	6	0,176	0,128	0,105	0,106	0,090	0,077
	7	0,159	0,165	0,180	0,131	0,127	0,100
	8	0,129	0,139	0,157	0,120	0,112	0,149
	Média	0,152	0,139	0,147	0,105	0,105	0,102
	Desvio Padrão	0,022	0,016	0,023	0,023	0,013	0,025

Tabela 15 – Haptoglobina. Os valores obtidos indicam a concentração da haptoglobina (g/L), dosada nos diversos grupos. A tabela também apresenta os valores das respectivas médias dos grupos e o desvio padrão obtido. Salina = solução salina a 0,9%, DMSO = Dimetilsulfóxido, DDS = 4-4' Diaminodifenilsulfona (dapsona), NAC = N-acetilcisteína. O veículo para injeção utilizado em todos os grupos (exceto grupo salina) foi o DMSO.

Haptoglobina

(Concentração (g/L))

Figura 24 – Haptoglobina. O gráfico apresenta os valores de máximo e mínimo obtidos através da dosagem sérica de haptoglobina, expressos em g/L, nos diversos grupos. São mostradas graficamente também a média e a mediana obtidas em cada grupo. Salina = solução salina 0,9%; DMSO = dimetil sulfóxido; DDS = dapsona 40mg/kg; NAC = N-acetilcisteína 75mg/kg; DDS + NAC juntas = dapsona 40mg/kg + N-acetilcisteína 75mg/kg aplicadas juntas; DDS + NAC 1h antes = dapsona 40mg/kg aplicada uma hora após a aplicação de N-acetilcisteína 75mg/kg. A análise de variância estatística foi realizada através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Asteriscos (*) representam grupos estatisticamente diferentes do grupo controle (salina) ($p < 0,05$).

O resultado apresenta uma variação entre os grupos. Os grupos NAC 75mg/kg, DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg juntas e DDS 40mg/kg + NAC 75mg/kg 1h antes apresentaram uma certa variação em relação ao grupo controle (salina). A baixa variação entre média e mediana demonstra uniformidade da distribuição de valores dentro de cada grupo.

5. DISCUSSÃO

Dentre os fármacos utilizados no tratamento para a hanseníase, a dapsona (4-4' diaminodifenil sulfona) é aquela que traz efeitos adversos hematológicos mais severos, como metemoglobinemia, anemia hemolítica e diminuição do tempo de vida dos eritrócitos (Coleman, 1995; Landers et al., 1996; Queiroz et al., 1997; Ward & McCarthy, 1998; Salamat & Watson, 2003). A dapsona possui também atividade contra a malária e contra a pneumonia causada pelo *Pneumocystis carinii*. Outro uso da dapsona se dá em situações inflamatórias como na dermatite herpetiforme (Coleman & Jacobus, 1993).

O uso deste medicamento, porém, é freqüentemente limitado, devido justamente aos seus efeitos adversos. A dapsona sofre no organismo um metabolismo por duas vias: N-acetilação e N-hidroxilação. O primeiro mecanismo produz um metabólito não reativo que após conjugação é facilmente eliminado (monoacetildapsona – MADDS), mas a via principal de seu metabolismo é a N-hidroxilação via citocromo P450 isoenzima CYP3A4. Esta via metabólica leva à formação de dois compostos hidroxilaminados (dapsona hidroxilamina – DDSNOH e monoacetildapsona hidroxilamina – MADDSNOH) (Figura 1).

Estes compostos são oxidantes potentes e responsáveis pelos efeitos adversos associados ao uso da dapsona. Quando as hidroxilaminas oxidam a hemoglobina, formam metemoglobina.

A N-acetilcisteína é um fármaco reconhecido como potente agente antioxidante, já que é precursor da glutathione, uma substância poderosa na remoção de radicais livres. Seu uso na terapia da intoxicação por paracetamol é um caso clássico. A N-acetilcisteína repõe os estoques de glutathione que um metabólito tóxico do paracetamol depleta, recuperando assim as defesas antioxidantes do indivíduo.

A NAC atua de diversas maneiras como antioxidante. Primeiramente, age de maneira extracelular reduzindo a cistina a cisteína, que é absorvida dez vezes mais rápido e pode ser utilizada na síntese de GSH. Facilitando essa síntese, a NAC tem um papel indireto como antioxidante, aumentando a atividade da glutathione-S-transferase, fornecendo GSH para a inativação de peróxidos através da atividade catalisada pela glutathione peroxidase. A NAC pode também agir diretamente sobre radicais reativos. A NAC apresentou atividade na prevenção do câncer em modelos animais (Simkeviciene et al, 2002). Em experimentos com radiação ionizante, a NAC apresentou propriedades antioxidantes (Neal et al, 2003). A N-acetilcisteína foi positivamente comparada com outros antioxidantes no dano renal e dermatológico no diabetes experimental (Odetti et al, 2003). O uso da NAC em tratamento de emergência de paciente terminal com doença renal por estresse oxidativo também foi relatado (Locatelli et al, 2003).

Com isto em vista, acreditávamos que o poder antioxidante da NAC seria benéfico na prevenção do efeito metemoglobinizante induzido pela dapsona.

Desta forma, embasados pela literatura no poder antioxidante da N-acetilcisteína, o objetivo do presente projeto sempre esteve voltado à investigação dos efeitos “*in vivo*” da administração da NAC na associação com dapsona. Apostando neste poder antioxidante e visando a obtenção de uma possível hemoproteção, escolhemos parâmetros objetivos para esta avaliação. Assim, a metodologia foi estabelecida para a determinação de metemoglobina, hemograma completo, reticulócitos, fragilidade osmótica e haptoglobina. Após a seleção dos testes, os grupos foram iniciados. Como mostra a Tabela 2, o veículo utilizado (DMSO) acarretava uma pequena variação na porcentagem de metemoglobinemia (salina: $0,30 \pm 0,04$ % e DMSO: $0,93 \pm 0,24$ %). Como outros veículos utilizados tais como o Cremophor acarretaram desidratação no animal por diarreia, preferimos manter o DMSO.

Na escolha da dose de DDS que melhor expressava a metemoglobinemia escolhemos a dose de 40 mg/kg, pois nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg a metemoglobinemia não mostrava dados reprodutíveis. Assim, após este estudo de dose, optamos por usar 40 mg/kg ($5,84 \pm 0,75$ %). É importante salientar que apesar do n de ratos ser de oito animais, estes experimentos foram validados com uma bateria de 48 animais por teste.

Após o estudo de dose da DDS, iniciamos o estudo com a NAC nas concentrações de 5, 10, 50, 75 e 100 mg/kg. A dose de 75 mg/kg foi a escolhida pelos valores encontrados ($0,73 \pm 0,30$ %). Repetimos várias vezes os experimentos, porém como a NAC também é dissolvida em DMSO, consideramos adequados os resultados. Iniciamos a associação administrando a NAC (75 mg/kg) uma hora antes da DDS (40 mg/kg), e qual não foi nossa surpresa quando avaliamos que os níveis de metemoglobina, ao invés de diminuir, aumentaram de $5,84 \pm 0,75$ % (DDS) para $14,86 \pm 1,21$ % (associação uma hora antes).

Imaginamos que nesta dose a NAC poderia estar se comportando como um pró-oxidante, assim iniciamos os testes com doses menores, e os resultados se mantiveram. Aumentamos o número de animais avaliados, na tentativa de certificarmos os resultados, e após uma bateria de seis grupos de oito animais cada, ratificamos realmente o resultado. A associação, ao invés de proteger, potenciava a oxidação do glóbulo vermelho.

Iniciamos assim um levantamento mais cuidadoso na busca de subsídios teóricos para tais acontecimentos. Contatos realizados com grupos do exterior nos informaram que a experiência deles era apenas “*in vitro*”, porém com resultados semelhantes aos nossos. Concluía também que a NAC, em relação à DDS, é um antioxidante de ação questionável.

Um estudo mais criterioso em relação ao seu metabolismo, porém, nos trouxe alguns esclarecimentos sobre outras possíveis rotas metabólicas de seus derivados hidroxilaminas.

A dapsona hidroxilamina reage com a oxiemoglobina (Fe^{2+}), para formar a metemoglobina (Fe^{3+}) e um nitrosobenzeno, que por sua vez é reduzido novamente até dapsona hidroxilamina pela NADH metemoglobina redutase, e qual não foi nossa surpresa, pela glutathione também. Esta hidroxilamina reage então com outra molécula de oxiemoglobina, continuando então o ciclo redox. Cada molécula de hidroxilamina é capaz de oxidar até cinco moléculas de oxiemoglobina, e o ciclo somente cessa quando a glutathione eritrocitária está quase completamente depletada.

Kramer et al. em 1972, trabalhando com anilinas em experimentos semelhantes, propuseram este mecanismo, o que também foi ratificado pelo nosso grupo, quando da associação entre DDS e NAC.

Figura 25 – Representação esquemática do ciclo de formação da metemoglobina nos eritrócitos, por ação da dapsona hidroxilamina e do oxigênio. É representado o ciclo redox que recupera o composto nitrosobenzeno até o precursor hidroxilaminado. DDS = Dapsona, DDS-NOH = Dapsona Hidroxilamina, DDS-NO = Dapsona Nitrosobenzeno, P_{450} = Citocromo P_{450} .

Tal mecanismo já havia sido sugerido por Coleman & Jacobus (1993) (Figura 26), porém como era um trabalho “*in vitro*”, necessitaria da confirmação “*in vivo*”. Assim, quando a hidroxilamina oxida o ferro da hemoglobina, há a formação de metemoglobina e um composto derivado da dapsona, um nitrosobenzeno (Figura 25). A glutathione age sobre este composto de duas formas distintas. Pode tanto reduzir o nitrosobenzeno até o precursor hidroxilamina como reagir com este composto formando uma sulfenamida (Figura 26).

Figura 26 – Representação esquemática do processo que leva à metemoglobinemia causada por dapsona hidroxilamina. É demonstrado também o metabolismo da DDS-NOH até o retorno à amina original (dapsona) A = Dapsona Hidroxilamina (DDS-NOH), B = Dapsona Nitrosobenzênio, C = Dapsona Sulfenamida, D = 4-4' Diaminodifenil Sulfona (dapsona), GSH = Glutathiona Reduzida, GSSG = Glutathiona Oxidada, HbFe²⁺O₂ = Hemoglobina, HbFe³⁺ = Metemoglobina.

No primeiro caso, quando há a formação da hidroxilamina a partir do nitrosobenzênio, o processo de formação de metemoglobina se reinicia, formando assim um ciclo redox que só termina quando os níveis de glutatona são reduzidos. Quando a dapsona nitrosobenzênio eventualmente escapa desse ciclo redox, pode se ligar à glutatona ou

outros grupos tióis formando uma sulfenamida ou outros aductos de estabilidade variável. A hidrólise desses aductos ou da sulfenamida liberaria então a amina livre (dapsona), que se difunde para fora do eritrócito e pode novamente ser metabolizada até os compostos acetilados ou hidroxilados.

Em relação à glutathione, os resultados obtidos (Tabela 3) mostram que realmente a dapsona consumiu glutathione ($8,13 \pm 0,87$ mg% contra $9,63 \pm 1,04$ mg% do grupo “salina”). A NAC apresentou um leve incremento dos níveis de glutathione ($10,39 \pm 1,37$ mg%), o que já era previsto. Os grupos tratados com os dois fármacos, tanto juntos como aplicando a NAC uma hora antes, não apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo “salina” (Figura 9). Isto se deve talvez ao fato de que nossos testes foram realizados em dose única e a glutathione é rapidamente regenerada no organismo. Uma queda acentuada da glutathione também não era esperada, já que ao aplicar a NAC, fornecemos cisteína para a síntese desse tripeptídeo.

A formação de metemoglobina pelos derivados metabólicos da dapsona (hidroxilaminas) já é bem estudada, e sabe-se que se trata de uma reação oxidativa. Vários marcadores dos possíveis efeitos adversos associados ao uso da dapsona estão disponíveis, e podem verificar o nível de dano provocado por essa exposição, além da dosagem da metemoglobina formada.

As bilirrubinas são formadas no catabolismo da hemoglobina, derivadas do grupamento heme, e se encontram elevadas no soro quando acontecem casos de hemólise intravascular.

A hiperbilirrubinemia ou icterícia podem ocorrer por cinco mecanismos:

- 1- Obstrução no fluxo da bile;
- 2- Redução na excreção da bile;
- 3- Problemas nas reações de conjugação da bilirrubina;
- 4- Deficiência na passagem da bilirrubina para os hepatócitos, ou
- 5- Superprodução de bilirrubina.

Um aumento da produção de bilirrubina normalmente está associado a uma degradação acelerada dos eritrócitos, que pode ser causada por vários fatores, como na hemólise induzida por medicamentos. Quando a taxa de hemólise supera a capacidade do fígado de eliminar a bilirrubina sérica, o paciente desenvolve hiperbilirrubinemia. A bilirrubina sérica normalmente não excede os 50 mg/dL em estados hemolíticos, e a bilirrubina está quase que totalmente não conjugada. Em anemias hemolíticas crônicas, como em casos de esferocitoses hereditárias, a superprodução prolongada de bilirrubina pode levar à formação de cálculos biliares (Kaplan, 1996).

A determinação da bilirrubina em amostras de sangue é útil, portanto, na avaliação de doenças hepatobiliares e hematológicas que cursam com alteração no metabolismo da bilirrubina.

O resultado das análises de bilirrubinas (Tabelas 4, 5 e 6) nos reporta um quadro de leve hemólise compensada. Para a bilirrubina total,

os grupos que apresentaram alguma diferença estatística em relação ao grupo “salina” ($0,308 \pm 0,056$ mg/dL) foram os grupos “NAC 75 mg/kg” ($0,377 \pm 0,038$ mg/dL), “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg juntas” ($0,395 \pm 0,057$ mg/dL) e “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg 1h antes” ($0,385 \pm 0,054$ mg/dL). Já a determinação da bilirrubina indireta, que normalmente se encontra aumentada em casos de hemólise intravascular, apresentou realmente um leve aumento, nos três grupos citados ($0,336 \pm 0,041$ mg/dL, $0,367 \pm 0,049$ mg/dL e $0,331 \pm 0,054$ mg/dL respectivamente), em relação ao grupo “salina” ($0,257 \pm 0,042$ mg/dL). Estes resultados eram esperados para os grupos “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg juntas” e “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg 1h antes”, mas o aumento reportado para o grupo “NAC 75 mg/kg” já não o era. A se considerar, temos os fatos de que os aumentos de bilirrubina, apesar de serem estatisticamente significativos, não necessariamente expressam situação patológica, já que quantitativamente este aumento não foi tão considerável. Estabelecer o grupo “salina” como parâmetro de comparação é um bom indicativo, mas como as elevações das dosagens não foram tão grandes, posteriores análises diversas, por nós realizadas, poderiam fornecer um quadro mais claro desta situação.

A enzima lactato desidrogenase (LDH), está presente no citoplasma de praticamente todas as células. Quando encontrada em altas concentrações no soro, é indicativo de lesão celular. Apesar de não

ser um indicador preciso ou específico, é de utilidade quando em conjunto a outros parâmetros.

A dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) reportou uma variância estatística um pouco maior (Tabela 7). Os grupos “DMSO” ($1978,61 \pm 308,53$ U/L), “NAC 75 mg/kg” ($1782,45 \pm 199,86$ U/L), “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg juntas” ($1835,99 \pm 213,87$ U/L) e “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg 1h antes” ($1747,12 \pm 254,52$ U/L) apresentaram variação estatisticamente significativa em relação ao grupo “salina” ($1226,25 \pm 142,72$ U/L). O único grupo que não apresentou variação significativa, estranhamente, foi o grupo “DDS 40 mg/kg” ($1149,42 \pm 116,24$). A LDH é uma enzima citoplasmática que aparece aumentada no soro quando há dano celular. Porém, como esta enzima está presente no organismo todo, não é um exame conclusivo. Uma análise mais acurada como, por exemplo, a quantificação das isoenzimas LDH₁ e LDH₂, poderia ter obtido resultados mais específicos.

Nas análises hematológicas, os resultados obtidos para a contagem de eritrócitos, determinação do hematócrito e dosagem da hemoglobina, apresentaram menor variância (Tabelas 8, 9 e 10). Apesar de algumas diferenças estatisticamente significantes, nenhum dos dados demonstrou algum desvio muito predominante ou com características patológicas.

Os índices eritrocitométricos, porém, apresentam variações mais significativas (Tabelas 11, 12 e 13). O Volume Corpuscular Médio (VCM)

exprime a relação entre o hematócrito e eritrócito, definido o espaço ocupado por cada eritrócito. Normalmente encontra-se diminuído em casos de anemias microcíticas hipocrômicas. Os grupos “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg juntas” ($73,61 \pm 7,25$ fL) e “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg 1h antes” ($73,30 \pm 4,89$ fL) apresentaram diminuição significativa do VCM em relação ao grupo “salina” ($83,75 \pm 3,18$ fL). A dosagem da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), que correlaciona a quantidade de hemoglobina com a quantidade de hemácias, apresentou apenas discreta variação nos valores do grupo “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg 1h antes” ($21,61 \pm 1,36$ pg) em relação ao grupo “salina” ($24,99 \pm 1,60$ pg). O cálculo da Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) não reportou nenhuma alteração em relação ao grupo “salina”. Isto, porém, não significa que o estado é normal, já que valores normais não afastam a hipótese de anemia hemolítica.

A análise das lâminas de esfregaço sanguíneo, coradas com May-Grunwald reporta algumas alterações celulares importantes. O grupo “salina” (Figura 21-A) apresentou hemácias predominantemente normais, com discretas poiquilocitose e hiperchromasia. Em uma lâmina do grupo “DMSO” (Figura 21-B) foi encontrado um eritroblasto, célula jovem, precursora da linhagem eritróide, normalmente não encontrada no sangue periférico. As lâminas do grupo “DDS 40 mg/kg” (Figura 21-C) apresentaram hemácias com poiquilocitose bem mais acentuada, relativa microcitose, certa hipocromia, com presença de “células em alvo” e

“estomatócitos”, característicos de patologias ligadas à hemoglobina. O grupo “N-acetilcisteína 75 mg/kg + dapsona 40 mg/kg juntas” (Figura 21-D) apresentou também poiquilocitose bastante acentuada, anisocitose, relativa hipocromia, presença de vários dacriócitos (célula em forma de gota) e de algumas hemácias “mordidas” (bite-cells), quadro bastante característico de quadros de anemia hemolítica.

A contagem de reticulócitos é fator importante na determinação de quadros de anemia hemolítica. Os grupos (Tabela 14) apresentaram discreta variação em relação ao grupo “salina” ($1,77 \pm 0,31 \%$). Os grupos “DMSO” ($2,70 \pm 0,54$), “NAC 75 mg/kg” ($2,83 \pm 0,69 \%$) e “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg juntas” ($2,62 \pm 0,55$) foram os que apresentaram variação com diferença estatística significativa. A observação das lâminas dos esfregaços sanguíneos, coradas com azul de cresil brilhante (Figura 22), demonstra esse aumento de reticulócitos nos grupos “NAC 75mg/kg” (Figura 22-B) e no grupo “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg juntas” (Figura 22-C), em relação ao grupo “salina” (Figura 22-A).

A fragilidade osmótica é um bom parâmetro para se avaliar a integridade das membranas dos eritrócitos, pois avalia o grau de elasticidade destas perante um gradiente de concentração salina. A Figura 23 apresenta as curvas de fragilidade osmótica para os diversos grupos. Apesar de uma diferença existir entre a maioria dos grupos e o

grupo “salina”, não podemos afirmar que é um estado patológico, já que esta diferença é muito pequena.

A haptoglobina, uma glicoproteína de fase aguda, é responsável pela captação da hemoglobina liberada pelos eritrócitos senis, e em casos de hemólise aguda tende a desaparecer no soro. Esta proteína liga-se à hemoglobina livre, assim facilitando sua remoção pelo sistema retículoendotelial. Assim, à medida que a hemoglobina é liberada no sangue, é conjugada à haptoglobina, evitando assim uma perda de ferro pelos rins. Deste modo, a haptoglobina sérica está diminuída em casos de hemólise intravascular, como resultado de sua ligação à hemoglobina e subsequente remoção.

Figura 27 – Esquema da degradação da hemoglobina (Hb). É representada a captação da Hb liberada de um eritrócito hemolisado, através da haptoglobina (Hp). O complexo Hp-Hb é internalizado por um macrófago por endocitose, para então serem degradados, liberando o ferro e bilirrubina. O processo tem a mediação da Interleucina-6 (Retirado de <http://www.umass.edu/karbon13/people/Wendell/wendell.htm>).

As dosagens de haptoglobina demonstraram que houve realmente redução estatisticamente significativa em seus níveis para os grupos “NAC 75mg/kg” ($0,105 \pm 0,023$ g/L), “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg juntas” ($0,105 \pm 0,013$ g/L) e “DDS 40 mg/kg + NAC 75 mg/kg 1h antes” ($0,102 \pm 0,025$), em relação ao grupo “salina” ($0,152 \pm 0,022$).

A dapsona é o quimioterápico de escolha no tratamento da hanseníase, na prevenção da malária e mais recentemente no controle da pneumonia causada pelo *Pneumocystis carinii*, em pacientes portadores do HIV. É importante ressaltar também seu potencial como fármaco antiinflamatório, porém seu uso clínico é restringido devido à sua hemotoxicidade, principalmente caracterizada pela metemoglobinemia e anemia hemolítica.

Neste contexto, são importantes estudos para tornar a dapsona um fármaco mais seguro, pois esta poderia ter seu uso clínico ampliado e também melhorarmos a qualidade de vida, principalmente de pacientes hansenianos em tratamento de longo prazo com o fármaco.

A N-acetilcisteína (NAC), fármaco de escolha no tratamento de intoxicações por paracetamol, na prevenção do câncer, no tratamento de lesão por estresse oxidativo a órgãos específicos e tratamento pela exposição a radiações, infelizmente não preveniu a hemotoxicidade da dapsona, e sim potencializou. Isto vem reforçar a necessidade de se aliar sempre a pesquisa experimental à farmacologia clínica, visando dar aos pacientes tratamentos que proporcionem máxima eficácia clínica, porém aliados ao mínimo de efeitos adversos.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

1 – Avaliando dados experimentais obtidos em ratos (n=48), constatamos que a dose ideal para a verificação da metemoglobina foi de 40 mg/kg de DDS ($5,84 \pm 0,75$).

2 – Em relação à N-acetilcisteína, os dados experimentais em ratos (n=48) apresentaram como dose ideal a concentração de 75 mg/kg, no que resguardava a porcentagem de metemoglobina formada ($0,73 \pm 0,30$), afirmando que a N-acetilcisteína não induz a formação de metemoglobina em ratos, de maneira estatisticamente significativa.

3 – A associação dapsona x N-acetilcisteína potencializou de forma significativa a hemotoxicidade induzida pela dapsona, como demonstrado pela porcentagem de metemoglobinemia apresentado pelos dois grupos onde realizamos a associação ($9,26 \pm 1,52$ e $14,86 \pm 1,21$)

4 – À luz dos conhecimentos atuais, concluímos que o referido aumento na hemotoxicidade da dapsona foi devido à produção de

glutathiona, gerada pela N-acetilcisteína (Figura 26). A glutathiona favorece a manutenção das N-hidroxisilaminas, por atuar como redutor do derivado nitrosobenzeno até novamente N-hidroxisilamina, fechando um ciclo redox.

5 – Em relação aos outros parâmetros estudados, as alterações encontradas foram consideradas clinicamente não significativas na grande maioria dos casos, apesar de todas as diferenças estatísticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSALIM, W.; FADEL, M. Oral methionine compared with intravenous N-acetylcysteine for paracetamol overdose. **Emerg. Med. J.**, v.20, n.4, p.366-7, 2003.

BALLATORI, N.; HAMMOND, C.L.; CUNNINGHAM, J.B.; KRANCE, S.M.; MARCHAN, R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.204, n.3, p.238-55, 2005.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. & Clin. Med.** v.61, n.5, p.882-88, 1963.

BLEUMINK, M.B. Relapses in leprosy patients after release from dapsone monotherapy, experience in the leprosy control program of the all Africa leprosy and rehabilitation training center (ALERT) in Ethiopia. **Int. J. Lepr.** v.60, p.161-72, 1992.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: **DNDSNUTES**, 1989.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Guia para implantar/implementar as atividades de controle da hanseníase nos planos estaduais e municipais de saúde. Brasília, **DGPE**, 1999.

BUCARETCHI, F.; MIGLIOLI, L.; BARACAT, E.C.E.; MADUREIRA, P.R.; DE CAPITANI, E.M.; VIEIRA, R.J. Acute dapsone exposure and methemoglobinemia in children: treatment with multiple doses of activated charcoal with or without the administration of methylene blue. **J. Pediatr.** v.76, n.4, p.290-4, 2000.

CAMBAU, E.; PERANI, E.; GUILLEMIN, I.; JAMET, P.; JI, B. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and floxacin in *Mycobacterium leprae*. **Lancet** v.349, p.103-4, 1997.

CHALASANI, P.; BAFFOE-BONNIE, H.; JURADO, R.L. Dapsone therapy causing sulfone syndrome and lethal hepatic failure in an HIV-infected patient. **South Med. J.** v.87, n.11, p.1145-6, 1994.

COLEMAN, M.D. Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. **Br. J. Dermatol.** v.129, p.507-13, 1993.

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

COLEMAN, M.D.; JACOBUS, D.P. Reduction of dapsone hydroxylamine to dapsone during methaemoglobin formation in human erythrocytes *in vitro*. **Biochem. Pharmacol.** v.45, n.5, p.1027-33, 1993.

DE ROSA, S.C.; ZARETSKY, M.D.; DUBS, J.G.; ROEDERER, M.; ANDERSON, M.; GREEN, A.; MITRA, D.; WATANABE, N.; NAKAMURA, H.; TJIOE, I.; DERESINSKI, S.C.; MOORE, W.A.; ELA, S.W.; PARKS, D.; HERZENBERG, L.A. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. **Eur. J. Clin. Invest.** v.30, n.10, p.915-29, 2000.

DELEVE, L.D.; KAPLOWITZ, N. Importance and regulation of hepatic glutathione. **Semin. Liver Dis.** v.10, p.251-66, 1990.

DOUGLAS, W.W. Histamine and 5-Hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonists. In: GILMAN, G.A.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **The pharmacological basis of therapeutics**. 7. Ed. New York: Macmillan publishing company, Cap. 26, p.624-27, 1980.

EDSTEIN, M.D.; RIECKMANN, K.H.; VEENENDAAL, J.R. Multiple-dose pharmacokinetics and *in vitro* antimalarial activity of dapsone plus pyrimethamine (Maloprim®) in man. **Br. J. Clin. Pharmacol.** v.30, n.2, p.259-65, 1990.

FIMLS, A.S. A combined theoretical & technical approach. **Hematology** p.423, 1989.

GROSSMAN, S.J.; JOLLOW, D.J. Role of dapsone hydroxylamine in dapsone induced hemolytic anemia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.244, n.1, p.118-25, 1988.

GROSSMAN, S.J.; SIMSON, J.; JOLLOW, D.J. Dapsone-induced hemolytic anemia: effect of N-hydroxyl dapsone on the sulfhydryl status and membrane proteins of rat erythrocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.117, p.208-17, 1992.

HAHN, R.; WENDEL, A.; FLOHE, L. The fate of extracellular glutathione in the rat. **Biochim. Biophys. Acta** v.539, p.324-37, 1978.

HARRISON, H. J.; JOLLOW, J. D. Role of aniline metabolites in aniline-induced hemolytic anemia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.238, n.3, p.1045-54, 1992.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Química clínica: bases y técnicas**. 2ª ed. Barcelona, Editorial JJMS, v.1 e v.2, 1980.

HOCHSTEIN, P. Perspectives on hydrogen peroxide and drug-induced hemolytic anemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Free Radic. Biol. Med.** v.5, p.387-92, 1988.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. **Clinical chemistry: theory, analysis and correlation**. 3rd ed. St. Louis: C.V. Mosby, 1996.

KRAMER, P.A.; GLADER, B.E.; LI, T.K. Mechanism of methemoglobin formation by diphenylsulfones. **Biochem. Pharmacol.** v.21, p.1265-74, 1972.

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

LAUTEBURG, B.H.; ADAMS, J.D.; MITCHELL, J.R. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. **Hepatology** v.4, 586-90, 1984.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2^a ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LESLIE, K.S.; GAFFNEY, K.; ROSS, C.N.; GARIOCH, J.J. A near fatal case of the dapsone hypersensitivity syndrome in a patients with urticarial vasculitis. **Clin. Exp. Dermatol.** v.28, n.5, p.496-8, 2003.

LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; STEVINKRL, P.; ZOCCALI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrol. Dial. Transplant** v.18, n.7, p.1272-80, 2003.

MEISTER, A. New developments in glutathione metabolism and their potential application in therapy. **Hepatology** v.4, p.739-42, 1984.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** v.52, p.711-60, 1983.

MEISTER A.; TATE, S.S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annu. Rev. Biochem.** v.45, p.559-604, 1976.

NEAL, R.; MATTHEUS, R.H.; LUTZ, P.; ERCAL, N. Antioxidant role of N-acetylcysteine isomers following high dose irradiation. **Free Radic. Med.** v.15, n.34, p.689-95, 2003.

ODETTI, P.; PESCE, C.; PATRI, S.; PRONZATO, M. Comparative trial of N-acetylcysteine, taurine, and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes. **Diabetes** v.52, n.2, p.499-505, 2003.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS) **Monitoramento da eliminação da hanseníase**. Brasília, janeiro 2004.

PAVITHRAN, K.; SATISH, T.C. Dapsone induced motor polyneuropathy in a patient with leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** v.65, n.2, p.262-3, 1997.

QUEIROZ, R.H.C.; MELCHIOR JR., R.; DE SOUZA, A.M.; GOUVEIA, E.; BARBOSA, J.C.; DE CARVALHO, D. Haematological and biochemical alterations in leprosy patients already treated with dapsone and MDT. **Pharm. Acta Helv.** v.72, n.4, p.209-13, 1997.

RANG, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. **Farmacologia**, 3^a Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 692p., 1997.

REITER, W.M.; CIMOCH, P.J. Dapsone-induced methemoglobinemia in a patient with *P. carinii* pneumonia and AIDS. **N. Engl. J. Med.** v.317, p.1740-1, 1987.

SALAMAT, A.; WATSON, H.G. Drug-induced methaemoglobinaemia presenting with angina follow the use of dapsone. **Clin. Lab. Haematol.** v.25, n.5, p.327-8, 2003.

SIMKEVICIENE, V.; STRAUSKAS J.; ULECKIENE, S. N-acetylcysteine and 2-amino-2-thiazoline N-acetyl-L-cysteinate as possible cancer chemopreventive agents in murine models. **Acta Biol. Hung** v.53, n.3, p.293-8, 2002.

SIMS, F.H.; HORN, C. Some observations on Powell's methods for the determination of serum bilirubin. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.29, p.412-7, 1958.

TIMOTHY, P.B.; MCMILLAN, D.C.; ROSALIE, K.C.; JOLLOWS, J. 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.

TINGLE, M. D.; COLEMAN, M. D.; PARK, B. K. An investigation of the role of metabolism in dapsone-induced methaemoglobinaemia using a two compartment in vitro test system. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.30, n.6, p.829-838, 1990.

VINCENZINI, M.T.; FAVILLI, F.; IANTOMASI, T. Glutathione-mediated transport across intestinal brush-border membranes. **T. Biochim. Biophys. Acta, Ser. Biomembr.** v.942, n.1, p.107-14, 1998.

WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacol. Rev.**, v.50, p.335-56, 1998.

WARD, K.E.; MCCARTHY, M.W. Dapsone-induced methemoglobinemia. **Ann. Pharmacother.**, v.32, n.5, p. 549-53, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly epidemiological record**. Geneva, No.13, 80th year, p.118-24, 2005.

WILLIAM, J. W.; BEUTLER, E.; ERSLEY, A.J.; LICHTMAN, M.A. **Hematology**. 4.ed. New York: McGraw-Hill p.1882, 1990.

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