

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial da Arginina na prevenção da  
hemotoxicidade induzida pela Dapsona em ratos**

Juliana Bordinassi Braghetto

Ribeirão Preto

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial da Arginina na prevenção da  
hemotoxicidade induzida pela Dapsona em ratos**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Toxicologia para a obtenção do título  
de Mestre em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia

Juliana Bordinassi Braghetto  
Orientadora: Profa. Dra. Maria de  
Lourdes Pires Bianchi

Ribeirão Preto

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Braghetto, Juliana Bordinassi.

Avaliação do potencial da Arginina na prevenção da hemotoxicidade induzida pela Dapsona em ratos.  
96 p. il., 30cm.

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

Orientadora: Bianchi, Maria de Lourdes Pires.

1. Dapsona.
2. Arginina.
3. Óxido Nítrico.
4. Metemoglobinemia e Anemia hemolítica.
5. Ação antioxidante.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Bordinassi Braghetto

Avaliação do potencial da Arginina na prevenção da hemotoxicidade induzida pela Dapsona em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do título de Mestre em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Agradeço a Deus por tudo que tenho, e tenho certeza de que nada é por acaso. Acredito que até mesmo os lugares por onde passo já estavam predestinados em minha vida, e se tenho tudo isso hoje, foi resultado de uma batalha muito grande, e sem fé e otimismo eu não conseguiria.*

*“Dedico aos meus pais Antônio e Zilda, ao meu irmão Thiago, ao meu noivo Jairo e a minha sogra Elizete que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, acreditando em mim e sabendo me dar força sempre que precisei”*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Aos grandes amigos Sônia, Joana Darc e Gilda competentes funcionários do Laboratório, que tanto me deram apoio, compreensão e amizade; e acima de tudo me ajudaram a concluir meu trabalho.

A todos da FCFRP, em especial meus amigos, Cidinha e João Paulo, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação.

Ao amigo Maurício que tanto me ajudou.

À Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes, por sua paciência e luta durante esse período de trabalho.

Ao Programa CAPES pela concessão de bolsa que me fez alcançar meu objetivo.

## RESUMO

Braghetto, J. B. **Avaliação do potencial da Arginina na prevenção da hemotoxicidade induzida pela Dapsona em ratos.** 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A dapsona, fármaco de escolha no tratamento da hanseníase, na prevenção da malária e no da pneumonia pelo *Pneumocystis carinii* vem sendo associada a casos clinicamente freqüentes, caracterizadas por metemoglobinemia e anemia hemolítica. Essa hemotoxicidade está diretamente relacionada à N-hidroxilação sofrida pelo fármaco. Com o objetivo de se verificar a inibição da hemotoxicidade acarretada pelos produtos de biotransformação reativos, a arginina, fármaco antioxidante, precursor do óxido nítrico, foi administrado concomitantemente à dapsona em ratos Wistar, em estudo de doses únicas e múltiplas, por gavagem: Grupo I: 40 mg/kg de dapsona. Grupos II, III, IV, V e VI; administração de 0.5%, 1.5%, 3%, 6% e 18% de arginina. Grupo VII, 0.5% de arginina antes de 40 mg/Kg de dapsona. Grupo VIII, 1.5% de arginina antes de 40 mg/Kg de dapsona, Grupo IX, 3,0% de arginina antes de 40 mg/kg de dapsona. Grupo X, 6,0% de arginina antes de 40 mg/kg de dapsona. Grupo XI, 18,0% de arginina antes de 40 mg/kg de dapsona. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos serão correlacionados com a concentração plasmática de dapsona, determinada por CLAE, na exposição à dapsona em monoterapia e na associação com a com a arginina. O resultado mostrou que a interação com a arginina e dapsona não protegeu da hemotoxicidade da dapsona, principalmente a metemoglobinemia e anemia hemolítica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dapsona, Arginina, Óxido Nítrico, Metemoglobinemia e Anemia hemolítica, Ação antioxidante.

## ABSTRACT

Braghetto, J. B. **Evaluation of the arginine potential in the prevention of the hemotoxicity prompted by dose Dapsone in mice.** 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The dapsone, medicine used in the treatment of Hansen's disease, in the malaria prevention and in pneumonia caused by *Pneumocystis carinii* is being associated to the clinically frequent cases, characterized by methemoglobinemia and hemolytic anemia. This hemotoxicity is directly related to the N-hydroxylation suffered by the medicine. With the target to verify the inhibition of the hemotoxicity occurred by the products of biotransformation reactive, the arginine, antioxidant, forerunner of the nitric oxide, will be dosed concurrently with dapsone in Wistar mice, with only one and multiple dose, per gavage: Group I: 40 mg/Kg of dapsone. Groups II, III, IV, V and VI: management the just one dose of 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% and 18,0% de arginine. Group VII: arginine 0,5% before of 40 mg/Kg dapsone. Group VIII: arginine 1,5% before of 40 mg/Kg dapsone. Group IX: arginine 3,0% before of 40 mg/Kg dapsone, Group X: arginine 6,0% before of 40 mg/Kg dapsone. Group XI: arginine 18,0% before of 40 mg/Kg dapsone The hematologic and biochemical parameters are related to the plasmatic concentration of dapsone, determined by CLAE, in the exposition to the dapsone in monotherapeutic and in the association with arginine. The result showed that the interaction with arginine and dapsone did not protect the hemotoxicity of the dapsone, mainly the methemoglobinemia and hemolytic anemia.

**KEY WORDS:** Dapsone, Arginine, Nitric oxide, Methemoglobin, and hemolytic anemia, Action antioxidant.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Biotransformação da dapsona e monoacetildapsona.....	21
<b>Figura 2:</b> Estrutura Química da Arginina.....	25
<b>Figura 3:</b> Determinação da Dapsona em plasma de ratos.....	44
<b>Figura 4:</b> Cromatogramas referentes a amostras de plasma.....	54
<b>Figura 5:</b> Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Única em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg, Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0% e DDS 40mg/Kg + Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%.....	56
<b>Figura 6:</b> Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Única em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg, Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%.....	56
<b>Figura 7.</b> Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Única em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg e DDS + Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%.....	57
<b>Figura 8.</b> Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Múltipla em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg, Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0% e DDS 40mg/Kg + Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%.....	63
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Múltipla em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg, Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%. .....	63
<b>Figura 10.</b> Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Múltipla em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg e DDS + Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%.....	64
<b>Figura 11.</b> Reatividade química na biologia química do Óxido Nítrico.....	69
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática do ciclo de formação da metemoglobina nos eritrócitos, por ação da dapsona hidroxilamina e do oxigênio.....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sintomas associados com os níveis de Metemoglobinemia.....	24
<b>Tabela 2:</b> Fluxograma dos procedimentos para coleta de dados – DOSE ÚNICA.....	37
<b>Tabela 3:</b> Fluxograma dos procedimentos para coleta de dados – DOSE MÚLTIPLA.....	39
<b>Tabela 4:</b> Limites de confiança do método de análise da dapsona no plasma.....	53
<b>Tabela 5:</b> Avaliação da precisão do método de análise da dapsona no plasma.....	53
<b>Tabela 6:</b> Porcentagem de metemoglobinemia em Dose Única com seu desvio padrão em ratos Wistar.....	55
<b>Tabela 7:</b> Determinação dos parâmetros bioquímicos: Desidrogenase láctica .....	57
<b>Tabela 8:</b> Determinação dos parâmetros bioquímicos: Bilirrubina total .....	58
<b>Tabela 9:</b> Determinação dos parâmetros bioquímicos: Bilirrubina direta .....	58
<b>Tabela 10:</b> Determinação dos parâmetros bioquímicos: Bilirrubina indireta .....	58
<b>Tabela 11:</b> Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Eritrócitos .....	59
<b>Tabela 12:</b> Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Hemoglobina .....	59
<b>Tabela 13:</b> Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Hematócrito .....	59
<b>Tabela 14:</b> Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Volume Corpuscular Médio.....	60
<b>Tabela 15:</b> Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Hemoglobina Corpuscular Média .....	60
<b>Tabela 16:</b> Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média .....	60
<b>Tabela 17:</b> Determinação dos parâmetros Hematológicos - série branca: Plaquetas.....	61
<b>Tabela 18:</b> Determinação dos parâmetros Hematológicos - série branca: Leucócitos.....	61
<b>Tabela 19:</b> Porcentagem de metemoglobinemia em Dose Múltipla com seu desvio padrão em ratos Wistar.....	62

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA: Análise Múltipla das Variâncias  
BH4: tetraidrobiopterina  
Ca<sup>++</sup>: cálcio  
CE: carboxiesterase  
CFZ: clofazimina  
CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média  
Cit.-b5/cit.b5 redutase: citocromo-b5/ citocromo-b5 redutase  
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência  
c-NOS: Óxido nítrico-sintase constitutiva  
CV- coeficiente de variação  
DDS: Dapsona  
DDS-NOH: dapsona hidroxilamina  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
EDRF: Fator de relaxamento derivado do endotélio  
e-NOS: Óxido nítrico-sintase endotelial  
FAD: flavina adenina dinucleotídeo  
FMN: flavina mononucleotídeo  
HCl: ácido clorídrico  
HCM: Hemoglobina Corpuscular Média  
i-NOS: Óxido nítrico-sintase induzível  
K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> : cianeto de ferro e potássio  
KCN: cianeto de potássio  
L-NA: NG-nitro-L-arginina  
L-NAA: NG-amino-L-arginina  
L-NAME: NG-nitro-L-arginina-metil-éster  
L-NIO: N-imino-etil-L-ornitina  
L-NMMA: NG-monometil-L-arginina  
MADDS: monoacetildapsona  
MADDS-NOH: monoacetildapsona hidroxilamina  
MHb: Metemoglobina  
MS: Ministério da Saúde  
NaCl: cloreto de sódio  
NADH: dinucleotídeo de adenina nicotinamida

NADPH: dinucleotídeo de adenina nicotinamida fosfato

NAT: N-acetiltransferases

NHA: NG-hidroxi-L-arginina

n-NOS: Óxido nítrico-sintase neuronal

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido nítrico-sintase

$O^{2-}$ : ânion superóxido

OMS: Organização Mundial de Saúde

$ONOO^-$ : peroxinitrito

$P_{450}$ : citocromo  $P_{450}$

PABA: ácido para-aminobenzóico

$PGE_2$ : prostaglandina E2

$PGF_2$ : prostaglandina F2

PQT: poliquimioterapia

$r^2$ : coeficientes de correlação

RMP: Rifampicina

RNA: ácido ribonucleico

SOD: superóxido dismutase

VCM: Volume Corpuscular Médio

## LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem

<: menor

>: maior

°C: grau Celsius

µg/L: micrograma por litro

µL: microlitro

cm: centímetro

g/dL: grama por decilitro

g: grama

M: molar

mg/dia: miligrama por dia

mg/dL: miligrama por decilitro

mg/kg: miligrama por kilo

mg/L: miligrama por litro

µg/mL: micrograma por mililitro

mg/mL: miligrama por mililitro

mg: miligrama

mL / min: mililitro por minuto

mL: mililitro

µm: micrometro

mm: milímetro

mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico

mmol/L: milimol por litro

N: Normal

nm: nanômetro

qsp: quantidade suficiente para

rpm: rotação por minuto

v/v: volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	18
1.1.1 Dapsona.....	18
1.1.2 Metemoglobin.....	23
1.1.3 Arginina e o Óxido Nítrico.....	24
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
3.1 Animais.....	34
3.2 Via de administração dos fármacos e regime de dosagem.....	34
3.3 Coleta de material após 2 horas da administração dos fármacos.....	36
3.4 Preparo da Amostra.....	41
3.5 Método de análise da dapsona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no plasma de ratos.....	41
3.5.1 Soluções Padrão e Reagentes.....	41
3.5.2 Análise Cromatográfica.....	41
3.5.3 Preparação da Amostra.....	42
3.5.4 Curva de Calibração.....	42
3.5.5 Recuperação.....	42
3.5.6 Precisão.....	43
3.5.7 Linearidade e Sensibilidade.....	43
3.5.8 Interferentes.....	43
3.6 Análise da metemoglobina por espectrofotometria.....	45
3.6.1 Método de Evelyn & Malloy (mod. Harrison & Jollow, 1986.).....	45
3.7 Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	45
3.7.1 Bilirrubina.....	45
3.7.2 Desidrogenase Láctica.....	47
3.8 Determinação dos parâmetros hematológicos.....	48
3.8.1 Eritrócitos.....	48
3.8.2 Hematócrito.....	49
3.8.3 Volume Corpuscular Médio (VCM).....	49
3.8.4 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM);.....	49
3.8.5 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).....	50
3.8.6 Reticulócitos.....	50
3.9 Análise Estatística.....	51
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 Análise Cromatográfica.....	53
4.1.1 Método para análise simultânea da Dapsona e Monoacetildapsona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no plasma de ratos.....	53
4.2 Regime de dosagem : dose única.....	54
4.2.1 Determinação da porcentagem de metemoglobina.....	54
4.2.2 Determinação Bioquímica.....	57
4.2.3 Determinação Hematológica.....	58
4.3 Regime de dosagem: Dose Múltipla.....	61
4.3.1 Determinação da porcentagem de metemoglobina.....	61
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>88</b>

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é considerada um problema de saúde pública com conseqüências sociais de discriminação e estigmatização. A Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs uma estratégia para retirar a hanseníase da lista de problemas de saúde pública, baseada em orientações técnicas e em poliquimioterapia (PQT) (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2005).

O Brasil continua sendo o segundo país em número de casos de hanseníase no mundo, após a Índia. Aproximadamente 94% dos casos conhecidos nas Américas e 94% dos novos diagnosticados são notificados no Brasil. A OMS em 1981 definiu novos esquemas terapêuticos, utilizando a associação da Dapsona (DDS), rifampicina e clofazimina para o tratamento da hanseníase. Ao longo das últimas décadas, as taxas de prevalência têm declinado ano a ano, resultado da consolidação do tratamento politerápico. Entretanto, as taxas de detecção de casos novos têm se mantido elevadas, e a expectativa é que a prevalência deverá ser inferior a 1/10.000 habitantes (CAMBAU et al., 1997; ARAÚJO, 2003; BRASIL, 1998, 1999, 2006).

A hanseníase é uma doença infecciosa, de evolução crônica que acomete predominantemente os nervos periféricos e, secundariamente, pele e mucosas (RANQUE et al., 2007). Seu agente etiológico é o *Mycobacterium leprae* descoberto por G.A. Hansen, em 1873. A infecção ativa pelo *M. leprae* é caracterizada por uma grande variabilidade no curso clínico, variando de uma doença paucibacilar na quais poucos bacilos estão presentes, a uma doença multibacilar, na qual uma grande carga bacilar está presente nas lesões. A detecção e o tratamento dos casos são ainda, na atualidade, os principais métodos usados para combater a hanseníase visando à interrupção da cadeia de transmissão da doença (GOULART et al., 2002; KUSTNER et al., 2006).

A Hanseníase tuberculóide (HT) é a forma paucibacilar da doença, onde encontram-se lesões bem delimitadas, em número reduzido, anestésicas e de distribuição assimétrica. Descrevem-se lesões em placas ou anulares com bordas papulosas, e áreas da pele eritematosas ou hipocrômicas. Seu crescimento centrífugo lento leva à atrofia no interior da lesão, que pode, ainda, assumir aspecto tricofitóide, com descamação das bordas. Há espessamento do tronco nervoso e dano neural vascular e nos troncos nervosos (ARAÚJO, 2003).

A Hanseníase virchowiana (HV) é uma forma multibacilar, reconhecida por corresponder ao pólo de baixa resistência, dentro do espectro imunológico da doença.



Portanto, manifesta-se naqueles indivíduos que apresentam imunidade celular deprimida para o *Mycobacterium leprae*. Sua evolução crônica caracteriza-se pela infiltração progressiva e difusa na pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos, podendo afetar, ainda, os linfonodos, o fígado e o baço. Na pele, descrevem-se pápulas, nódulos e máculas. A infiltração é difusa e mais acentuada na face e nos membros. A pele torna-se luzidia, xerótica, com aspecto apergaminhado e tonalidade semelhante ao cobre (ARAÚJO, 2003).

O *M. leprae* é um bacilo com alto poder infectante e baixo poder patogênico. Depois da sua entrada no organismo, não ocorrendo a sua destruição, este irá se localizar na célula de Schwann e na pele. Sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença, nas quais o agente infectante não encontra resistência contra a sua multiplicação. Nesse caso, os linfonodos, olhos, testículos e fígado podem abrigar grande quantidade do bacilo (ARAÚJO, 2003).

O fator natural de defesa do organismo é conhecido à partir do teste de Mitsuda – resposta positiva ao reagente indica resistência ao bacilo de Hansen, e negativa indica vulnerabilidade (WHO, 2005).

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; DALE; RITTER, 1997).

A dapsona (DDS) firmou-se, como o principal fármaco anti-hansênico e estratégico para o controle da doença na década de 1950; porém descoberta em 1937.

Posteriormente, a partir de 1962, a clofazimina (CFZ) testada por Browne & Hogerzeil e a rifampicina (RMP), por Opromolla, também começaram a ser utilizadas no tratamento da hanseníase.

No entanto, a monoterapia apresentava-se como a causa mais freqüente de desenvolvimento da resistência ao medicamento e a utilização de, no mínimo, dois fármacos potentes ajudariam a superar esse problema.

Tendo conhecimento desse fato, a OMS, em 1981, introduziu a quimioterapia combinada com três fármacos, conhecida como poliquimioterapia (PQT), que consiste no uso dos três fármacos considerados os mais eficazes, a saber: Dapsona (DDS) + Clofazimina (CFZ) + Rifampicina (RMP) (GOULART et al.; 2002; KUSTNER et al., 2006).

A PQT começou a ser implementada no Brasil em 1986 e, em 1991, foi adotada oficialmente pelo Ministério da Saúde (MS), sendo o tratamento poliquimioterápico recomendado para todos os casos de hanseníase. Todavia, sua administração chegou a ser

questionada pelos Centros de Saúde espalhados pelo país, em função dos muitos casos de efeitos adversos (MIZIARA; GONCLIM; MINITI, 1992; TALARICO; METRO, 2005).

Em relação aos efeitos adversos relacionados aos esquemas terapêuticos empregados na hanseníase, a literatura em uma avaliação mais criteriosa apresenta com frequência quadros de metemoglobinemia e anemia hemolítica associados à exposição à DDS (COLEMAN, 1995; LANDERS et al., 1996; QUEIROZ et al., 1997; SALAMAT; WATSON, 2003; WARD; McCARTHY, 1998). Agranulocitose, problemas hepáticos e renais, dermatite esfoliativa, neuropatia periférica, febre, cefaléias, psicoses e fotodermatite, também são outros efeitos citados, porém com menor frequência (LESLIE et al., 2003; PAVITHRAN; SATISH, 1997).

As reações adversas observadas em razão da terapia com as sulfonas vêm sendo relatadas desde 1944 e a descrição do primeiro caso parece estar relacionada a um paciente nigeriano no qual febre, linfodite, esplenomegalia, icterícia, mononucleose, dermatite esfoliativa e alterações hepáticas foram observadas. Ao longo dos anos, avaliação retrospectiva à exposição envolvendo a dapsona, evidenciou que a frequência das reações adversas, ora vem sendo associada à dose, ora a reações de hipersensibilidade (Coleman, 1995; Timoth, 1997; Ward e Mc Carthy, 1998).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo básico, avaliar a eficácia da Arginina em prevenir o principal efeito adverso da dapsona, a metemoglobinemia e a anemia hemolítica em ratos Wistar.

## 1.1 ASPECTOS GERAIS

### 1.1.1 Dapsona

A dapsona (4,4'-diamino-difenil sulfona) encontra-se no centro de toda terapêutica anti-hansênica e age através da competição com o ácido para-aminobenzóico (PABA), diminuindo ou bloqueando a síntese do ácido fólico bacteriano.

A dapsona é um pó cristalino, branco e inodoro e é classificada como uma sulfona bacteriostática e antiinflamatória (GOULART et al., 2002). Com sua ação antibacteriana, apresenta ação bacteriostática para o *Mycobacterium leprae*, com uma sensibilidade estimada em torno de 1 a 10mg/mL, e uma incidência de cerca de 19% de cepas resistentes ao fármaco. E com sua ação antiinflamatória, os mecanismos de sua atividade não estão completamente compreendidos (MIZIARA; GONCLIM; MINITI, 1992; TALARICO; METRO, 2005).

A dapsona tem absorção quase completa pelo trato gastrintestinal. Sua distribuição se dá por toda a água corpórea, atingindo quase todos os tecidos. A concentração na maioria dos órgãos não difere significativamente do sangue. Tende a se manter na pele, músculo, fígado e rins, permanecendo nestes órgãos até 3 semanas após a interrupção do tratamento. Quanto à excreção, ocorre quase que totalmente (70-80%) por via renal, sob a forma de metabólitos inativos (MIZIARA; GONCLIM; MINITI, 1992).

Dapsona e monoacetildapsona (MADDS) são principalmente encontradas na urina na forma conjugada com o ácido glicurônico (MELLO, 2005).

Apresenta 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 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. A dapsona se liga às proteínas plasmáticas entre 70 a 90%, e a MADDS com ligação de 99% a estas proteínas (MELLO, 2005).

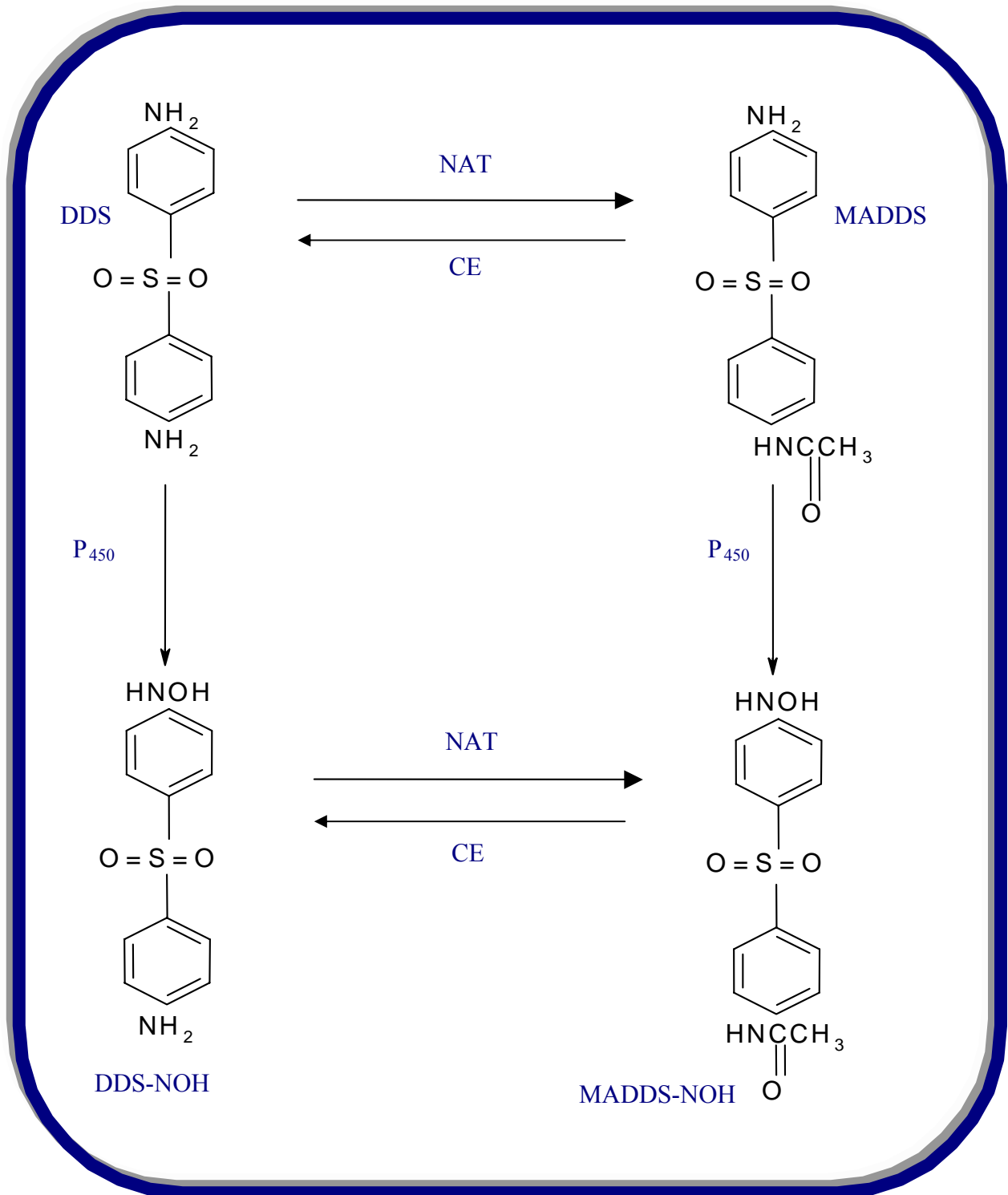
No homem, a DDS é extensivamente biotransformada, tendo como via principal a acetilação que se processa à custa de enzimas designadas de N-acetiltransferases (NAT) (Figura 1). Estas enzimas estão presentes principalmente no fígado e mucosa jejunal e são responsáveis pela formação do produto de biotransformação, 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 (GROSSMAN; SIMSON; JOLLOW, 1992; MELLO, 2005).

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 (GROSSMAN; SIMSON; JOLLOW, 1992; TINGLE; COLEMAN; PARK, 1990). A instabilidade química e a reatividade dos produtos hidroxilados dificultam a determinação destes, nos fluidos biológicos. Um outro inconveniente são as baixas concentrações plasmáticas (MELLO, 2005).

A N-hidroxilação é efetuada no fígado, pelo sistema oxidase de função mista – citocromo P<sub>450</sub> presente no retículo endoplasmático. Essa reação ocorre na presença de oxigênio molecular e NADPH (MELLO, 2005).

A hidroxilação, é a responsável pela formação de produtos de biotransformação reativos, as N-hidroilaminas da DDS e MADDS, acarretando reações adversas significativas, principalmente em nível do sistema hematológico (COLEMAN, 1995; GROSSMAN; JOLOW, 1988; GROSSMAN; SIMSON; JOLLOW, 1992).



**Figura 1.** Biotransformação da dapsona e monoacetildapsona

NAT = N-acetiltransferase, CE = carboxiesterase, P<sub>450</sub> = citocromo P<sub>450</sub>, DDS = dapsona, DDS-NOH = dapsona hidroxilamina, MADDS = monoacetildapsona, MADDS-NOH = monoacetildapsona hidroxilamina.

**Fonte:** Grossman e Jollow (1988)

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 (COLEMAN, 1995).

O outro efeito adverso descrito com o uso da dapsona é a hemólise, que ocorre em quase todos os pacientes que usam de 200-300mg/dia do fármaco, sendo menos freqüente quando se utilizam doses menores (100mg/d) (SATO et al., 1997).

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

Chalasanani, Baffoe-Bonnie e Jurado (1994), em estudo clínico relatou o primeiro caso de uma paciente de 34 anos infectada com HIV, que apresentou anemia hemolítica e hepatite seguida de morte, devido a reação de hipersensibilidade à DDS.

Timothy et al. (1997), através de estudos em humanos, comparou os metabólitos hidroxilados da DDS e do sulfametoxazol, concluindo que tanto a dapsona hidroxilamina, como a sulfametoxazol hidroxilamina, induziram a formação de metemoglobinemia. Comparativamente, a dapsona hidroxilamina foi significativamente mais potente na capacidade de indução à formação de metemoglobina. Foi observado ainda por esses mesmos autores, 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.

Ward e McCarthy, em 1998, observaram através de estudos em pacientes transplantados submetidos a hemodiálise, desenvolvimento de dispnéia acompanhada de uma elevação dos níveis de metemoglobina, após 9 dias de tratamento com DDS.

A toxicidade da DDS pode ser categorizada tanto como dose dependente ou de reação idiossincrática.

A anemia hemolítica e a metemoglobinemia, causadas pelo uso da DDS, vêm sendo associadas a uma desnaturação oxidativa na membrana dos eritrócitos, aumentando sua rigidez, favorecendo a recaptção esplênica, acelerando os processos de hemólise celular. Tem sido 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;).

A intoxicação por sulfonas determina uma interferência sobre a atividade enzimática intraeritrocitária, particularmente da glicose-6-fosfato-desidrogenase que é deprimida. A deficiência dessa enzima, condicionando uma formação restrita de NADH determina um decréscimo no fornecimento de elétrons necessário a redução da hemoglobina, continuamente oxidada, ficando desta forma, incapaz de carrear oxigênio.

### 1.1.2 Metemoglobina

Agentes metemoglobinizantes são substâncias capazes de induzir a oxidação de um dos átomos de ferro da hemoglobina.

A função biológica da hemoglobina é o transporte do oxigênio aos tecidos. Sua forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) é a metemoglobina, que não transporta oxigênio. Portanto, a presença de metemoglobina em quantidades elevadas é incompatível com a vida (FERNÍCOLA; AZEVEDO, 1981).

A metemoglobina apresenta cor castanha avermelhada e mostra um pico de absorvância a 630nm, quando em pH ácido (FIMLS, 1989).

Metemoglobina é a oxidação do componente heme da hemoglobina ao estado férrico, ou seja, é a forma da hemoglobina na qual o ferro é oxidado, do estado ferro II para o estado ferro III, não podendo ligar-se ao oxigênio (CHAMPE; HARVEY, 1996; DEVLIN, 1998; TALARICO; METRO, 2005).

Os eritrócitos contêm normalmente pequenas quantidades de metemoglobina, resultantes da oxidação espontânea (FERNÍCOLA; AZEVEDO, 1981)

O eritrócito dispõe de sistemas redutores capazes de restaurar eficientemente a função da hemoglobina, mantendo os níveis de MHb ao redor de 1%. A forma predominante de redução endógena é realizada por um sistema ligado ao NADH – dinucleotídeo de nicotinamida – e adenina reduzida, conhecido como metemoglobina redutase (também conhecido como NADH – diaforase ou citocromo b5 redutase). A NADH – diaforase catalisa um passo da via principal da redução da metemoglobina. Esta enzima reduz o citocromo b5, 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. Pequenas quantidades podem ser reduzidas também pelo ácido ascórbico e pela glutatona (ác. ascórbico/ glutatona) (OGA, 2003; TALARICO; METRO, 2005).

Indivíduos com deficiência desses sistemas citocromo-b5/ citocromo-b5 redutase utilizam como agentes redutores a flavina reduzida, a cisteamina e a cistina reduzida. Essas moléculas desempenham papel secundário na redução.

Pode-se caracterizar metemoglobinemia quando uma concentração superior a 5% da hemoglobina está na forma oxidada. Valores de 1,5% até 2% de metemoglobina são considerados normais.

A metemoglobinemia adquirida é a forma mais comum em consequência à exposição de substâncias químicas com potencial oxidante, tais como sulfonas, sulfonamidas, anilina e derivados, metoclopramida, anestésicos locais e azul de metileno em altas doses. Dentre estas, a dapsona (DDS) tem sido citada como um dos principais fármacos que têm acarretado metemoglobinemia, na intoxicação aguda e mesmo em doses terapêuticas (BUCARETCHI et al., 2000; QUEIROZ et al., 1997).

A manifestação clínica das metemoglobinemias elevadas é a cianose refratária à oxigenioterapia. Níveis acima de 30% de metemoglobinemia já começam o aparecimento dos sintomas, e, níveis de 60 a 70% são considerados fatais (Tabela 1) (OGA, 2003; SINGH; PURNELL, 2005).

**Tabela 1- Sintomas associados com os níveis de Metemoglobinemia**

<b>% MHb*</b>	<b>Sintomas</b>
< 10	Cansaço, cefaléia, dores nos membros inferiores
10-20	Cianose perceptível na pele
20-30	Ansiedade, tontura, cefaléia, taquicardia
30-50	Fadiga, confusão, vertigem, taquipnéia, taquicardia elevada
50-70	Coma, convulsões, arritmias, acidose
> 70	Morte

\*15g/dL de hemoglobina como referência; teores menores podem exacerbar os sintomas.

Fonte: Oga (2003)

### 1.1.3 Arginina e o Óxido Nítrico

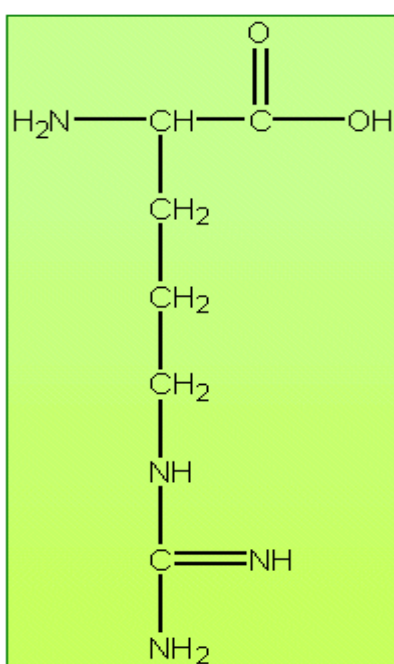
A arginina é um aminoácido não essencial, mas que pode ser considerado condicionalmente essencial em certas circunstâncias como crescimento, recuperação de trauma, etc. Portanto, a arginina é considerada um aminoácido semi-essencial (LEHNINGER, 1986).



A arginina pode ser encontrada em alguns alimentos como: no aipo, alfafa, batata, beterraba, cenoura, pepino, rabanete, carnes, leite, ovos, queijos, alho, ervilhas, grãos e chocolates (NOVAES; BEAL, 2004).

A arginina possui um grupo R carregado positivamente (básico), o grupo guanidino. A arginina possui cinco átomos de carbono e um sexto carbono ligado através de um átomo de nitrogênio (Figura 2) (LEHNINGER, 1986).

A L-arginina, ácido (L)-2-amino-5-guanidinovalérico é um sólido (cristalino e branco), praticamente sem odor, de alto ponto de fusão, devido aos 2 grupos polares, solúvel em água e sensível a luz (NOVAES; BEAL, 2004).



**Figura 2.** Estrutura Química da Arginina

Fonte: Lehninger (1986)

A L-Arginina é precursora na gênese do Óxido Nítrico (NO). O Óxido Nítrico é produzido na célula endotelial pela enzima Óxido Nítrico sintase a partir da L-arginina (LEITE; SARNI, 2003; SILVA et al., 2006).

A síntese do NO é resultante da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, o qual é convertido em L-citrulina. Essa reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A síntese de NO envolve duas etapas: inicialmente ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-arginina (NHA). Como essa reação utiliza NADPH e oxigênio, muito provavelmente envolve o complexo heme da NOS.

A segunda etapa é caracterizada pela conversão da NHA em NO e citrulina (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

A flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH4) são utilizados como co-fatores na reação (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Os trabalhos de investigação neste campo demonstram, de forma clara, que a formação de NO a partir de arginina, faz parte de amplo sistema de comunicação intercelular, cujo alvo principal, em nível intracelular, é a guanilato ciclase, responsável, quando estimulada, pela formação de monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) (KNOBEL, 1996; ROSSELI; KELLER; DUBEY, 1998).

De forma inequívoca, temos que o NO é liberado por neutrófilos, por células mononucleares sangüíneas, pelo tecido cerebral, pelas células epiteliais renais, pela medula adrenal e pelos mastócitos. Além destas, algumas células, tais como macrófagos e as células de Kupffer hepáticas, "matam" outras células, através do NO (KNOBEL, 1996; ROSSELI; KELLER; DUBEY, 1998).

O NO possui mecanismos para manter a concentração de arginina livre, através de sua produção intracelular, possivelmente a partir da l-citrulina (KNOBEL, 1996; ROSSELI; KELLER; DUBEY, 1998).

Em lesões e outros locais onde ocorre inflamação, foi observada redução na concentração de arginina e aumento na concentração de ornitina, resultantes da ação da arginase, derivada de macrófagos. A atividade da arginase, que também está aumentada em células tumorais, promove proliferação e regeneração tissular, por fornecer ornitina, substrato para a síntese de poliaminas e de tecido colágeno. Desta forma, a baixa concentração, resultante do consumo da arginina, aumenta as funções associadas com a ativação dos macrófagos. A interação entre estas duas vias metabólicas da arginina, levando à formação de uréia/ornitina ou NO/citrulina, é da maior importância na biologia dos macrófagos (MAXWELL, 2002).

Em condições normais, a arginina endógena é suficiente para a manutenção do bem estar, mas, em condições de estresse oxidativo ou de indução enzimática, a sua suplementação se faz necessária, uma vez que foi demonstrado, em macrófagos, que a depleção da arginina pode levar a morte celular. Atualmente, sabemos que a depleção de arginina pode estar envolvida na hipertensão, espasmo vascular e/ou aterosclerose. Com base na indução ampla da resposta imune, tanto "in vitro" quanto "in vivo", e pelos seus efeitos e ausência de

toxicidade, foi sugerido a sua utilização como mais uma tentativa terapêutica no tratamento da AIDS/HIV (MAXWELL, 2002).

O NO é um importante regulador de cloreto de sódio e na absorção de água pelos rins. Foi demonstrado que o NO endógeno formado a partir da L-arginina inibe a absorção de cloreto de sódio (ORTIZ et al., 2003).

Nos últimos anos foram descobertas três isoformas da enzima Óxido Nítrico Sintase. As enzimas NO isoformas são agrupadas em duas categorias, sendo: a *NOS constitutiva (c-NOS)*, dependente de íons cálcio ( $Ca^{++}$ ) e de calmodulina, envolvida na sinalização celular, e a *NOS induzível (i-NOS)*, produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A c-NOS e a i-NOS divergem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e na sua capacidade de síntese de NO. A enzima isoforma constitutiva compreende a *NOS neuronal (n-NOS, tipo I)*, ocorre normalmente nos neurônios, e a *NOS endotelial (e-NOS, tipo III)*, está principalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A c-NOS sintetiza baixos teores de NO, da ordem de nano ou picomols, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de  $Ca^{++}$  (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; RADOMSKI et al., 1990).

No entanto, a i-NOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas. Essa enzima isoforma requer algumas horas para ser expressa, porém, uma vez produzida, pode liberar quantidades maiores de NO do que a c-NOS. A produção deste NO continua indefinidamente até que a L-arginina ou os seus co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou, ocorra a apoptose (DUSTING; MACDONALD, 1995).

Já as enzimas isoformas de NOS também podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, tais como a NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-NAA), NG-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS (REES et al., 1990).

Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas um radical livre. Atualmente, o NO se constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares (MARLETTA, 1994)

O NO pode desempenhar papel citotóxico ou citoprotetor para o fígado. Entre os efeitos citoprotetores está o seu papel como seqüestrador de radicais livres, aumento da síntese de enzimas de reparo do DNA, diminuição da síntese durante a isquemia-reperfusão, bloqueio da liberação de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub> e a diminuição do crescimento de células tumorais. Age, também, como coadjuvante no tratamento dos processos infecciosos em geral, inclusive nos causados pelo estresse. O aspartato de L-Arginina reforça, ainda, a capacidade muscular (MIRANDA et al., 2004). O Óxido Nítrico é uma molécula, que apresenta múltiplas funções no organismo. Dentre estas, ele estimula a resposta imunológica mediada por linfócitos e macrófagos; é também um mensageiro biológico que controla o tônus vascular, que é produzido pelo endotélio vascular normal, sendo responsável pelo Fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (LEITE; SARNI, 2003).

O NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo (GEWALTIG, KOJDA, 2002; WOLIN, 2000)

Dentre os mecanismos protetores do NO estão: ação vasodilatadora, efeito antiagregante plaquetário, efeito antioxidante, inibição da lipoperoxidação, inibição da liberação do radical superóxido pelos polimorfonucleares, inibição da quimiotaxia de leucócitos, inibição da expressão de moléculas de adesão, inibição da proliferação e diferenciação de macrófagos, inibição da mitogênese e proliferação de células musculares lisas, inibição da proliferação da íntima, inibição da liberação de componentes da matriz extracelular (MCALLISTER; LAUGHLIN, 2006; YAMAMOTO; ALVES; PICON, 1997).

De acordo com a literatura, o NO apresenta um papel ora como oxidante, ora como antioxidante. Como efeito antioxidante, este tem a propriedade de varredor fisiológico e/ou inativador do radical superóxido (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; YAMAMOTO; ALVES; PICON, 1997).

No entanto, o mesmo grupo de pesquisadores, em um outro trabalho, determinou que, em ausência de ânion superóxido, o NO tem a capacidade de inibir a oxidação de LDL. Este efeito antioxidante do NO seria através da interrupção da cadeia autocatalítica da peroxidação lipídica iniciada pelas espécies ativas de oxigênio. Portanto, a concentração de ânion superóxido seria um fator crítico no comportamento biológico do NO: em situações nas quais aquele está presente em excesso, o efeito antioxidante do NO é suprimido, sendo gerado peroxinitrito, um potente pró-oxidante (YAMAMOTO; ALVES; PICON, 1997).

O estresse oxidativo do vaso contribui para as doenças tromboembólicas. O NO produzido pela e-NOS induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o O<sup>2-</sup> disponível e, conseqüentemente, a

produção de  $\text{ONOO}^-$ . O NO também induz a síntese de ferritina, que se liga a íons ferro livres e previne a geração de  $\text{O}^{2-}$  (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; EVANS, FITZGERALD; 2005).

Segundo alguns pesquisadores, o NO teria uma ação antioxidante através dos seguintes mecanismos: 1) ligação com o ferro presente em compostos que participam das reações oxidativas, inibindo as reações radicalares mediadas por este metal; 2) reação com outros radicais intermediários, tanto na fase líquida como na lipídica, terminando reações oxidativas. Ressalta-se o fato de que a constante  $k$  de reação do NO com lipoperóxidos é muito maior do que a  $k$  da reação destes com o alfa-tocoferol, antioxidante clássico de terminação de cadeia; 3) nos casos em que a lesão biológica esteja especificamente relacionada à toxicidade do ânion superóxido, sua reação "redirecionaria" esta toxicidade através da formação do radical peroxinitrito, que, por sua vez, poderia ser decomposto por mecanismos menos tóxicos ou mais eficientes. O consumo do radical superóxido pela reação com o NO reduziria também a formação de peróxido de hidrogênio, uma outra espécie ativa de oxigênio que participa do estresse oxidativo na parede vascular. Determinaram também que o NO inibe a síntese de radical superóxido pelos polimorfonucleares atuando sobre a NADPH oxidase, o que poderia ser um mecanismo adicional de proteção, evitando a formação daquele em uma fonte importante como são os PMNs, não se descartando a possibilidade de que esta inibição ocorra também em outras células (YAMAMOTO; ALVES; PICON, 1997).

O tratamento de coelhos com dieta rica em colesterol ou com dieta hipercolesterolêmica, mais um inibidor da NOS (L-NAME), aumenta a produção de radical superóxido em anéis aórticos; já em coelhos tratados com dieta rica em colesterol e L-arginina, a produção de radical superóxido retorna aos níveis iniciais. Além disso, o relaxamento vascular colinérgico dependente de endotélio foi parcialmente restabelecido neste último grupo de animais; os autores sugeriram que a L-arginina normaliza a função endotelial aumentando a produção de NO e diminuindo a inativação do mesmo pelo radical superóxido (YAMAMOTO; ALVES; PICON, 1997).

Vários doadores de NO inibem diversas funções dos polimorfonucleares, como a síntese de leucotrieno B<sub>4</sub>, a quimiotaxia, degranulação e a liberação de radical superóxido, processos estes envolvidos na aterogênese. O NO inibe também a adesão de polimorfonucleares, o que estaria relacionado à capacidade de inativar o ânion superóxido, além de inibir a expressão de moléculas de adesão (E-seletina, VCAM-1) induzida por

citocinas no endotélio. Ademais, em condições experimentais, o NO tem a capacidade de reduzir a peroxidação das LDL (YAMAMOTO; ALVES; PICON, 1997).

Trabalhos recentes sobre os efeitos da Indometacina no intestino demonstraram que a droga produz radicais livres induzindo dano aos enterócitos. E também foram realizados estudos para designar possíveis mecanismos bioquímicos da indometacina induzindo danos renais. De acordo com estes, histologicamente os rins demonstraram anormalidades na mitocôndria (túbulo proximal). Evidências de estresse oxidativo foram encontradas nos rins associado com a disfunção mitocondrial. A composição lipídica na mitocôndria também foi alterada. Tais efeitos foram abolidos pela administração prévia da arginina, graças ao efeito seqüestrador de radicais livres do NO. O óxido nítrico demonstrou redução no dano gastrintestinal causado pelos antiinflamatórios não-esteroidais em modelos animais como também em humanos. Suplementação de arginina antes do tratamento com indometacina resultou na supressão das mudanças nos parâmetros de estresse oxidativo, assim como a supressão das mudanças das enzimas seqüestrador de radicais livres, que anteriormente, com o tratamento somente com a indometacina, se apresentava com severas alterações como: taxa de estresse oxidativo aumentado e níveis das enzimas seqüestrador de radicais livres diminuídos. A administração da L-NAME (inibidor da NOS) junto com a arginina anulou o efeito protetor da arginina sobre todos esses parâmetros avaliados, indicando que o efeito foi mediado pela produção de NO. Esses estudos comprovam a ação do NO como antioxidante, podendo assim anular as reações adversas da dapsona (BASIVIREDDY et al., 2004).

## **2. OBJETIVO**

---

---

- Avaliar a eficácia da arginina em prevenir o principal efeito adverso do uso da dapsona, a metemoglobinemia e anemia hemolítica, em ratos Wistar.
  
- Avaliar a concentração plasmática da dapsona por cromatografia líquida de alta eficiência X concentração de metemoglobinemia no tratamento com DDS e na associação com arginina.



## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3.1 Animais

Foram utilizados 13 grupos na dose única e 13 grupos na dose múltipla (n=08) de ratos *Wistar*, machos, adultos, com peso variando entre 200 a 220 gramas, que foram obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. Os animais foram alojados em número de quatro 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 alternado de 12 horas de claro e escuro. Água e comida foram fornecidas “*ad libitum*” durante todo o experimento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, protocolo nº 06.1.461.53.6.

### 3.2 Via de administração dos fármacos e regime de dosagem

#### Vias de Administração:

A via de administração utilizada foi a intraperitoneal para dapsona e a via oral para a arginina. A via de administração utilizada nos experimentos foi a via intraperitoneal para dapsona e gavagem para arginina. A dapsona foi dissolvida em DMSO, e a L-arginina em água destilada.

#### Regime de dosagem: dose única

#### Controles:

**Grupo Controle do veículo da Dapsona:** 200µL de DMSO via intraperitoneal.

**Grupo Controle do veículo da Arginina:** 200µL de água destilada por gavagem.

#### Dapsona:

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

#### Arginina:

**Grupo II:** 200µL de uma solução de 0,5% de L-arginina por gavagem.

**Grupo III:** 200µL de uma solução de 1,5% de L-arginina por gavagem.

**Grupo IV:** 200µL de uma solução de 3,0% de L-arginina por gavagem.

**Grupo V:** 200µL de uma solução de 6,0% de L-arginina por gavagem.

**Grupo VI:** 200µL de uma solução de 18,0% de L-arginina por gavagem.

**Arginina + Dapsona:**

**Grupo VII:** 200µL de uma solução de 0,5% de arginina em água por gavagem 2 horas antes de 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal.

**Grupo VIII:** 200µL de uma solução de 1,5% de arginina em água por gavagem 2 horas antes de 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal.

**Grupo IX:** 200µL de uma solução de 3,0% de arginina em água por gavagem 2 horas antes de 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal.

**Grupo X:** 200µL de uma solução de 6,0% de arginina em água por gavagem 2 horas antes de 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal.

**Grupo XI:** 200µL de uma solução de 18,0% de arginina em água por gavagem 2 horas antes de 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal.

**Regime de dosagem : dose múltipla**

**Controles:**

**Grupo Controle do veículo da Dapsona:** doses de 200 µL de DMSO administradas por via intraperitoneal.

**Grupo Controle do veículo da Arginina:** doses de 200µL de água destilada por gavagem, durante cinco dias consecutivos.

**Dapsona:**

**Grupo I:** 200µL de água destilada por gavagem durante 5 dias consecutivos e 200µL de uma solução de 40mg/Kg de dapsona em dimetilsulfóxido (DMSO), administrada por via intraperitoneal, no quinto dia.

**Arginina:**

**Grupo II:** 200µL de uma solução de 0,5% de L-arginina por gavagem durante 5 dias consecutivos.

**Grupo III:** 200µL de uma solução de 1,5% de L-arginina por gavagem durante 5 dias consecutivos.

**Grupo IV:** 200µL de uma solução de 3,0% de L-arginina por gavagem durante 5 dias consecutivos.

**Grupo V:** 200µL de uma solução de 6,0% de L-arginina por gavagem durante 5 dias consecutivos.

**Grupo VI:** 200µL de uma solução de 18,0% de L-arginina por gavagem durante 5 dias consecutivos.

**Arginina + Dapsona:**

**Grupo VII:** 200µL de uma solução de 0,5% de arginina em água por gavagem durante 4 dias e 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal, no quinto dia.

**Grupo VIII:** 200µL de uma solução de 1,5% de arginina em água por gavagem durante 4 dias e 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal, no quinto dia.

**Grupo IX:** 200µL de uma solução de 3,0% de arginina em água por gavagem durante 4 dias e 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal, no quinto dia.

**Grupo X:** 200µL de uma solução de 6,0% de arginina em água por gavagem durante 4 dias e 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal, no quinto dia.

**Grupo XI:** 200µL de uma solução de 18,0% de arginina em água por gavagem durante 4 dias e 40mg/Kg de dapsona em DMSO por via intraperitoneal, no quinto dia.

### **3.3 Coleta de material após 2 horas da administração dos fármacos**

Para a realização da coleta de sangue, os ratos foram anestesiados por inalação de dióxido de carbono através da câmara de CO<sub>2</sub>, após duas horas da administração dos fármacos, determinado nos estudos de dose, segundo o tempo de meia-vida da dapsona e da L-arginina. A eutanásia foi realizada após a coleta de sangue através da exposição ao dióxido de carbono em câmara de CO<sub>2</sub>.

As tabelas 2 e 3 ilustram todos os procedimentos que foram realizados.

**Tabela 2 – Fluxograma dos procedimentos para coleta de dados – DOSE ÚNICA**

Horário	Grupo Controle Veículo	Procedimento
0:00	200µL DMSO i.p.	
2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo Controle Veículo	Procedimento
0:00	200µL Água dest. por gavagem	
2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo I	Procedimento
0:00	200µL DDS 40 i.p.	
2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo II	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 0,5% gavagem	
2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo III	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 1,5% gavagem	
2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo IV	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 3,0% gavagem	
2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo V	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 6,0% gavagem	
2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo VI	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 18,0% gavagem	
2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.

continuação

**Tabela 2 – Fluxograma dos procedimentos para coleta de dados – DOSE ÚNICA**

Horário	Grupo VII	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 0,5% gavagem	
2:00	200µL DDS 40mg/Kg i.p.	
4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo VIII	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 1,5% gavagem	
2:00	200µL DDS 40mg/Kg i.p.	
4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo IX	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 3,0% gavagem	
2:00	200µL DDS 40mg/Kg i.p.	
4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo X	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 6,0% gavagem	
2:00	200µL DDS 40mg/Kg i.p.	
4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo XI	Procedimento
0:00	200µL L-arginina 18,0% gavagem	
2:00	200µL DDS 40mg/Kg i.p.	
4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.

**Tabela 3 – Fluxograma dos procedimentos para coleta de dados – DOSE MÚLTIPLA**

<b>Horário</b>	<b>Grupo Controle Veículo</b>	<b>Procedimento</b>
120:00	200µL DMSO i.p.	Administradas durante 5 dias
+2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
<b>Horário</b>	<b>Grupo Controle Veículo</b>	<b>Procedimento</b>
120:00	200µL água destilada gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
<b>Horário</b>	<b>Grupo I</b>	<b>Procedimento</b>
120:00	200µL água destilada gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	DDS 40MG/kg i.p.	
+4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
<b>Horário</b>	<b>Grupo II</b>	<b>Procedimento</b>
120:00	200µL L-arginina 0,5% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
<b>Horário</b>	<b>Grupo III</b>	<b>Procedimento</b>
120:00	200µL L-arginina 1,5% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
<b>Horário</b>	<b>Grupo IV</b>	<b>Procedimento</b>
120:00	200µL L-arginina 3,0% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
<b>Horário</b>	<b>Grupo V</b>	<b>Procedimento</b>
120:00	200µL L-arginina 6,0% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.

continuação

**Tabela 3 – Fluxograma dos procedimentos para coleta de dados – DOSE MÚLTIPLA**

Horário	Grupo VI	Procedimento
120:00	200µL L-arginina 18,0% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo VII	Procedimento
120:00	200µL L-arginina 0,5% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	DDS 40mg/Kg i.p.	
+4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo VIII	Procedimento
120:00	200µL L-arginina 1,5% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	DDS 40mg/Kg i.p.	
+4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo IX	Procedimento
120:00	200µL L-arginina 3,0% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	DDS 40mg/Kg i.p.	
+4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo X	Procedimento
120:00	200µL L-arginina 6,0% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	DDS 40mg/Kg i.p.	
+4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.
Horário	Grupo XI	Procedimento
120:00	200µL L-arginina 18,0% gavagem	Administradas durante 5 dias
+2:00	DDS 40mg/Kg i.p.	
+4:00	Coleta de sangue	Quantificações metemoglobinemia, DDS plasmática, parâmetros bioquímicos e hematológicos.



### 3.4 Preparo da Amostra

Com parte do sangue total, o teor de metemoglobina do animal foi avaliado. O restante do sangue foi centrifugado para a separação do plasma, e armazenado em freezer (-20°C) para subsequente determinação dos níveis de dapsona plasmática, análises bioquímicas e hematológicas.

### 3.5 Método de análise da dapsona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no plasma de ratos.

A análise descrita a seguir (figura 4) foi padronizada no laboratório de toxicologia da FCFRP-USP, e foi validada em plasma de rato.

#### 3.5.1 Soluções Padrão e Reagentes

As soluções-padrão de dapsona (Sigma) e padrão-interno (fenacetina) foram preparados em metanol grau cromatografia (Merck). A solução-estoque de dapsona, preparada na concentração de 1 mg/mL, foi diluída para a obtenção das concentrações plasmáticas correspondentes a 1,25, 2,5, 12,5, 25 e 50 µg/mL, para a dapsona em regime de dose única e múltipla. A solução de fenacetina foi preparada na concentração de 50 µg/mL. O éter etílico (Nuclear) foi destilado. O n-hexano usado para a purificação do extrato foi de grau análise de resíduos (Merck). O cloreto de sódio que foi empregado e a solução de hidróxido de sódio 1,5 N foram tratados com o solvente de extração (éter etílico). A água usada na fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q e filtrada em membranas de 0,45 µm (Millipore® R). Os solventes utilizados na extração ou na fase móvel foram previamente filtrados em membranas de 0,5 µm (Millipore® R).

#### 3.5.2 Análise Cromatográfica

A determinação plasmática da dapsona foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo líquido **Shimadzu - modelo LC-10AS**, equipado com injetor "*Rheodyne*" modelo **7125**, amostrador de 10 µL, detector por absorvância no ultravioleta (**Shimadzu modelo SPD-10A**) operando em 286 nm, coluna de

fase reversa (C8, **LiChrocart® 100 - Merck** - 125 x 4 mm, partículas de 5 µm), a fase móvel foi constituída de água : metanol (63 : 37 v/v ), o fluxo utilizado foi de 1 mL / min. Os cromatogramas foram obtidos em integrador **Shimadzu -C-R6A chromatopac**.

### 3.5.3 Preparação da Amostra

A 0,5 mL da amostra (plasma) foram adicionados 50 µL de padrão interno (fenacetina), 200 µL de solução de hidróxido de sódio 1,5 N e 200 mg de cloreto de sódio. Foram extraídas com 7 mL de éter etílico (durante 30 minutos de agitação mecânica), e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. As fases orgânicas foram transferidas para tubos cônicos e adicionadas de 50 µL de HCl 1N, em metanol. Após a evaporação sob corrente de ar, a temperatura ambiente, os resíduos foram retomados com 50 µL de fase móvel e 50 µL de n-hexano. Após agitação em mixer durante 1 minuto e centrifugação por 30 segundos a 3000 rpm, 10 µL da amostra (fase móvel) foram injetados.

### 3.5.4 Curva de Calibração

As curvas de calibração foram obtidas a partir do enriquecimento de plasma branco (0,5 mL) com 25 µL de cada solução de uso de dapsona. Estas amostras adicionadas foram extraídas conforme descrito anteriormente.

### 3.5.5 Recuperação

Para a verificação da recuperação absoluta, amostras de plasma adicionadas dos fármacos foram extraídas em triplicatas, segundo o procedimento proposto. As fases orgânicas obtidas foram adicionadas de 50 µL da solução do padrão interno e evaporados até a secura, sob fluxo de ar, à temperatura ambiente. Os resíduos, após reconstituição com 50 µL de fase móvel e purificação com 50 µL de hexano, foram cromatografados segundo as condições estabelecidas.

As concentrações dessas amostras foram calculadas através das curvas de calibração, construídas com dados da análise cromatográfica dos fármacos, não submetidos ao procedimento de extração, ou seja, soluções-padrão, foram retomadas com fase móvel, purificadas com hexano e cromatografadas.

As recuperações relativas foram obtidas de maneira similar com exceção da adição do padrão interno nas amostras de plasma antes do procedimento de extração.

### **3.5.6 Precisão**

Amostras de plasma branco (n=10) foram adicionadas de soluções-padrão diluídas para a obtenção de concentrações de 2,5 e 25,0 µg/mL de dapsona. A análise foi segundo o método de verificação de precisão intra-ensaio. Para verificação de precisão inter-ensaios, amostras de plasma branco adicionadas de concentrações idênticas dos fármacos em estudo, foram analisadas durante 5 dias consecutivos.

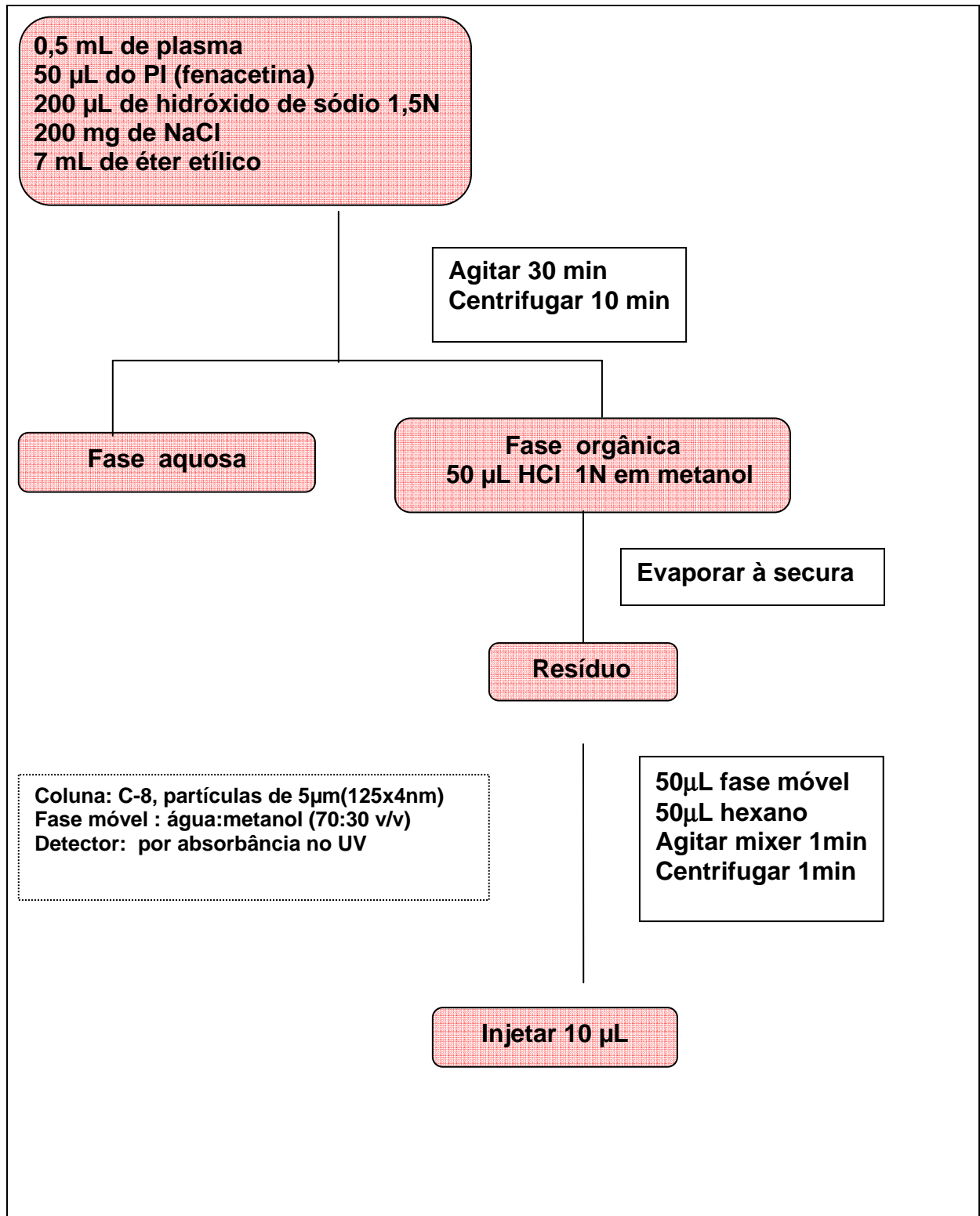
### **3.5.7 Linearidade e Sensibilidade**

A linearidade foi observada analisando amostras de plasma branco, em triplicatas, adicionadas de soluções-padrão do fármaco, para a obtenção de concentrações de 0,1 a 100,0 µg/mL para DDS com adição de 50µL de padrão interno. O intervalo de concentrações foi considerado linear quando da obtenção de coeficiente de variação inferior a 10%.

A sensibilidade foi determinada analisando amostras de plasma branco adicionadas de soluções-padrão para obtenção de concentrações de 0,1 µg/mL, para dapsona. O método foi considerado sensível, na menor concentração onde o coeficiente de variação obtido em 5 determinações foi inferior a 10%.

### **3.5.8 Interferentes**

Na avaliação de possível interferência de componentes endógenos presentes no plasma do rato frente aos compostos analisados, um “pool” de plasma de ratos foi analisado.



**Figura 3.** Determinação da dapsona em plasma de ratos

### 3.6 Análise da metemoglobina por espectrofotometria

#### 3.6.1 Método de Evelyn e Malloy (mod. HARRISON; JOLLOW, 1992)

Foi utilizado um espectrofotômetro E-225 D-CELM-205 S, operando em 635 nm. O material utilizado foi: 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 500  $\mu$ 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 4 tubos numerados de 1 a 4. O tubo 1 permanece somente com o sangue hemolisado, os tubos 2 e 4 foram adicionados de 50  $\mu$ L de KCN a 10 %. Nos tubos 3 e 4, 50 $\mu$ 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 foi realizado pela fórmula a seguir :

$$\% \text{ de Metemoglobina} = \frac{A1 - A2}{A3 - A4} \times 100$$

### 3.7. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados no presente trabalho foram determinados através da aplicação de kits de acordo com a literatura especializada e consagrada pelo uso junto aos Laboratórios de Análises Clínicas.

#### 3.7.1 Bilirrubina

O método utilizado foi desenvolvido em 1958, por Sims e Horn. A bilirrubina foi determinada por diazotização e doseamento do corante azóico, que tem absorção máxima em 525nm. 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 (460mmol/L); Ácido Sulfanílico 0,1% (v/v); Nitrato de sódio 0,5% (v/v); Diazo reagente (preparado na hora do uso); Solução padrão de bilirrubina 10mg/dL

O reagente Acelerador promove rápida solubilização e diazotização da bilirrubina indireta possibilitando obter soluções coradas totalmente livres de turvação. A estabilização do Nitrito de Sódio constitui fator de segurança na dosagem, permitindo o armazenamento de todos os reagentes a temperatura ambiente.

#### Método Analítico:

Após colher o sangue, esperar 40 minutos para que haja retração do coágulo e depois centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos. Foi utilizado o KIT LABTESTE, com a técnica Macro. Foi feito em duplicata, portanto nesse ensaio os volumes foram reduzidos à metade.

Tomar 3 tubos de ensaio (Branco, Bilirrubina Direta e Total) mais um tubo do Padrão e um do Branco Padrão. No tubo Branco colocar 2,25 mL de água destilada ou deionizada, 0,25 mL de ácido sulfanílico e 0,15 mL da amostra; no tubo Direta: 2,25 mL de água destilada ou deionizada, 0,25 mL de Diazo reagente e 0,15 mL da amostra; no tubo Total: 2,25 mL do Acelerador, 0,25 mL de Diazo reagente e 0,15 mL da amostra; no tubo Padrão: 2,25 mL do Acelerador, 0,25 mL do Diazo reagente e 0,15 mL do padrão; e no tubo Branco Padrão: 2,25 mL do Acelerador e 0,15 mL do padrão.

Mistura agitando cada tubo e esperar 5 minutos. Determinar a absorbâncias das Bilirrubinas direta e total em 525 nm ou filtro verde (500 a 540), acertando o zero com branco (cada amostra tem o seu branco). A cor é estável por 30 minutos.

- Preparo do reagente Diazo:

Para 10 amostras e o padrão preparar 12 mL do ácido sulfanílico (nº 2) e misturar e usar no dia da preparação. Usar o conta gotas exatamente na posição vertical. Adicionar 4 gotas de Nitrito de Sódio para 6 ml de ácido sulfanílico.

Cálculo:

$$\text{Bilirrubina (mg/ dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 10$$

### 3.7.2 Desidrogenase Láctica

A enzima lactato desidrogenase (ou desidrogenase láctica) 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:

Tampão (200 mmol/L) pH 8,2, substrato (tampão 200 mmol/L + ácido láctico 260 mmol/L, padrão (150 U/I), 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:

Após colher o sangue, esperar 40 minutos para que haja retração do coágulo e depois centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos. Foi utilizado o KIT LABTESTE fazendo em duplicata.

Tomar 3 tubos de ensaio (Controle, Teste e Padrão). No tubo Controle adicionar 0,5 mL de Tampão e 0,025 mL da Amostra; no tubo Teste 0,5 mL do Substrato e 0,025 mL da Amostra e no tubo Padrão 0,5 mL do Tampão e 0,025 mL do Padrão.

Incubar em banho Maria a 37 °C durante de 2 minutos. O nível da água do banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos e ensaio.

Acrescentar aos tubos Controle e Teste 0,1 mL do Reagente de Cor. Misturar e incubar em banho Maria a 37 °C exatamente 5 minutos (cronometrados).

Depois disso, adicionar à todos os tubos 1,0 mL do Estabilizador. Misturar e deixar à temperatura ambiental 5 minutos.

Determinar as absorbâncias do controle, teste e padrão em 500 nm, acertando o zero com água destilada ou deionizada. A cor é estável por 30 minutos.

Cálculos:

$$\text{Desidrogenase Láctica} = \frac{\text{Abs. do teste} - \text{Abs. do Controle}}{\text{Abs. do Padrão}} \times 150$$

### **3.8 Determinação dos parâmetros hematológicos**

#### **3.8.1 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. Conta-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 100 mL).

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<sup>3</sup> de sangue:



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

### 3.8.2 Hematócrito

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 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.

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

### 3.8.4 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.

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

### 3.8.5 Concentração de 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.

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

### 3.8.6 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 de cresil brilhante (1g) e solução fisiológica 0,9% (100 mL).

Método Analítico:

Colocou-se 2 gotas de sangue e 2 gotas de solução corante em um tubo de ensaio 11 x 75 mm. Misturou-se e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Após este tempo, realizou-se o esfregão 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  $\text{mm}^3$ , através da seguinte fórmula:

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

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

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

### 3.9 Análise Estatística

Os testes foram realizados com auxílio dos “softwares” *GraphPad Instat®*, *Statgraphics®* e *Origin®*. Para o estudo da análise das médias *Análise Múltipla das Variâncias* (ANOVA) e análise de comparação múltipla entre os grupos (Tukey-Kramer). O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

---

---

#### 4.1 Análise Cromatográfica

Os dados apresentados nas Tabelas 4 e 5 evidenciam a alta sensibilidade, reprodutibilidade e seletividade dos métodos analíticos. Os cromatogramas apresentados na Figura 4 mostram que os componentes endógenos do plasma não interferem nos métodos analíticos. Os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) obtidos mostram relação linear entre as áreas dos picos e as concentrações plasmáticas.

##### 4.1.1 Método para análise da Dapsona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no plasma de ratos.

**Tabela 4 -Limites de confiança do método de análise da dapsona no plasma**

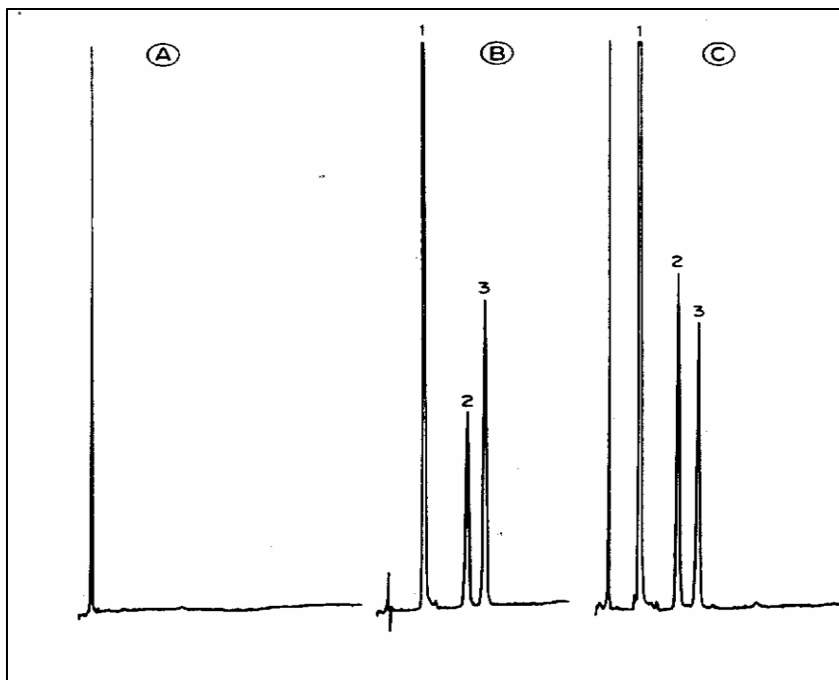
Parâmetro	DDS
Recuperação Absoluta (%)	93
CV (%)	6,0
Recuperação Relativa (%)	97
CV (%)	5,0
Limite de Quantificação (mg/mL)	0,10
CV (%)	8,2
Linearidade (mcg/mL)	0,1-100
Coefficiente de linearidade ( $r^2$ )	0,999

DDS- dapsona,  $r^2$ - coeficiente de correlação linear, CV- coeficiente de variação

**Tabela 5 -Avaliação da precisão do método de análise da dapsona no plasma**

	Amostra A			Amostra B		
	N	Média (µg/mL)	CV (%)	n	Média (µg/mL)	CV (%)
<b>Intra-ensaios</b>						
DDS	10	2,15	5	10	22,8	5,8
<b>Inter-ensaios</b>						
DDS	5	2,02	8,5	5	20,8	6,4

DDS- dapsona, n- número de amostras, CV - coeficiente de variação.



**Figura 4** . Cromatogramas referentes a amostras de plasma : A - plasma branco; B - plasma enriquecido com soluções-padrão; C - plasma de rato em tratamento com dapsona: 1) dapsona; 2) monoacetildapsona; 3) fenacetina (padrão interno)

Coluna : RP - 8, partículas de 5  $\mu\text{m}$  ( 125 x 4 mm ). Fase móvel : água : metanol ( 63 : 37 v/v ) .  
Detector : por absorvância no UV ( 286 nm )

## 4.2 Regime de dosagem : Dose Única

### 4.2.1 Determinação da porcentagem de metemoglobina

Após colher o sangue, a porcentagem de metemoglobina foi determinada por espectrofotometria.

A Tabela 6 e Figura 5, 6 e 7 mostram as porcentagens de metemoglobina dos grupos controle que receberam Água Destilada, DMSO, dapsona 40mg/kg e arginina 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0%.

De acordo com valores obtidos, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de metemoglobina com o grupo que recebeu água destilada e arginina 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0%, apenas o grupo que recebeu arginina 0,5% não sofreu metemoglobinemia.

Observou-se dentre os valores obtidos dos grupos que receberam DMSO, dapsona 40mg/kg, um aumento na porcentagem de metemoglobina, provocado pela administração de dapsona 40mg/kg.

A Tabela 6 e Figura 5, 6 e 7 representam também as porcentagens de metemoglobina entre os grupos que receberam DMSO, dapsona 40mg/kg e arginina 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0% administrada 2h antes da dose de dapsona 40mg/kg.

Comparando-se os valores da porcentagem de metemoglobina entre dapsona (DDS) e DDS + arginina, observou-se uma diferença significativa com aumento do efeito tóxico dos grupos que receberam arginina 0,5% ( $p < 0,05$ ), 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0% ( $p < 0,001$ ) previamente à dose de dapsona 40mg/kg.

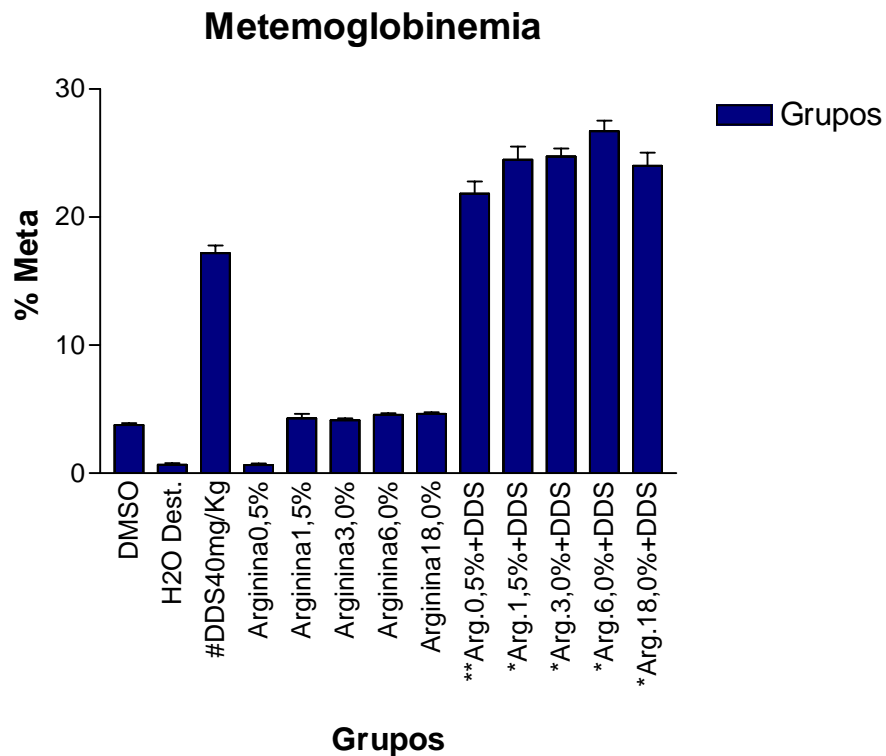
**Tabela 6- Porcentagem de metemoglobinemia em Dose Única com seu desvio padrão em ratos Wistar**

<i>GRUPOS</i>	<i>Média % MeHb</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>
DMSO	3,77	±0,43	8
H2O Dest.	0,67	±0,33	8
DDS 40mg/Kg	17,18#	±1,71	8
Arginina 0,5%	0,65	±0,33	8
Arginina 1,5%	4,29	±0,97	8
Arginina 3,0%	4,13	±0,45	8
Arginina 6,0%	4,56	±0,37	8
Arginina 18,0%	4,63	±0,37	8
Arg.0,5% + DDS	21,83**	±2,7	8
Arg.1,5% + DDS	24,49*	±2,91	8
Arg.3,0% + DDS	24,73*	±1,77	8
Arg.6,0% + DDS	26,71*	±2,33	8
Arg.18,0% + DDS	24,01*	±2,92	8

\* Diferença estatística significativa quando comparada com o grupo DDS 40mg/Kg  $p < 0,001$

\*\* Diferença estatística significativa quando comparada com o grupo DDS 40mg/Kg  $p < 0,05$

# Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DMSO  $p < 0,001$

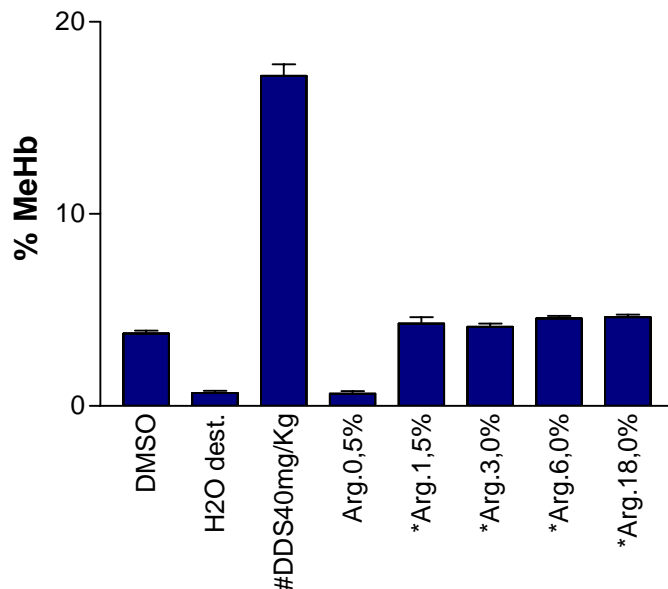


**Figura 5.** Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Única em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg, Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0% e DDS 40mg/Kg + Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%

\* Diferença estatística significativa quando comparada com o grupo DDS 40mg/Kg  $p < 0,001$

\*\* Diferença estatística significativa quando comparada com o grupo DDS 40mg/Kg  $p < 0,05$

# Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DMSO  $p < 0,001$

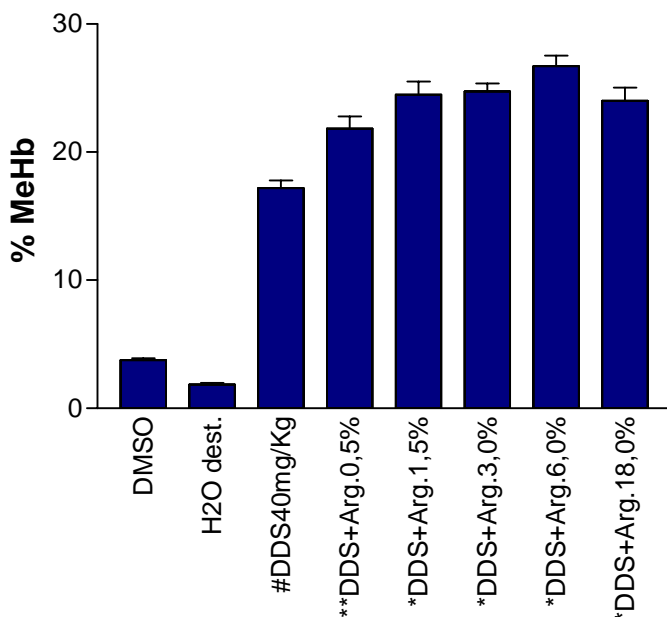


**Figura 6.** Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Única em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg, Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%.

# Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DMSO  $p < 0,001$



\* Diferença estatística significativa quando comparada com o grupo da Água



Destilada

**Figura 7.** Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Única em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg e DDS + Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%.

\* Diferença estatística significativa quando comparada com o grupo DDS 40mg/Kg  $p < 0,001$

\*\* Diferença estatística significativa quando comparada com o grupo DDS 40mg/Kg  $p < 0,05$

# Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DMSO  $p < 0,001$

#### 4.2.2 Determinação Bioquímica

A Tabela 7, 8, 9, 10 representa os valores da Desidrogenase láctica, Bilirrubina total, direta e indireta, entre os grupos que receberam DMSO, dapsona 40mg/kg e arginina 1,5%, 3,0% e 6,0% administrada 2h antes da dose de dapsona 40mg/kg.

**Tabela 7:** Determinação dos parâmetros bioquímicos: Desidrogenase láctica

<b>GRUPOS:</b>	<b>Desidrog. Lática (U/L)</b>	<b>Desvio Padrão (+/-)</b>
<b>DMSO</b>	382,80	139,1
<b>L-Arginina 1,5%</b>	532,51	69,648
<b>L-Arginina 3,0%</b>	956,08*	199,22
<b>L-Arginina 6,0%</b>	700,31*	139,18
<b>DDS 40mg/Kg</b>	532,78	34,242
<b>L-Arg1,5%+DDS</b>	454,43	158,95
<b>L-Arg3,0%+DDS</b>	318,66#	60,256
<b>L-Arg6,0%+DDS</b>	474,56	141,96

\*Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DMSO  $p < 0,001$

#Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DDS  $p < 0,05$

**Tabela 8:** Determinação dos parâmetros bioquímicos: Bilirrubina total

<i>GRUPOS:</i>	Bilirr Total (mg/dL)	Desvio Padrão (+/-)
DMSO	0,3865	0,1345
L-Arginina 1,5%	0,097	0,0711
L-Arginina 3,0%	0,4264	0,3717
L-Arginina 6,0%	0,3481	0,2174
DDS 40mg/Kg	0,3279	0,1277
L-Arg1,5%+DDS	0,2965	0,1399
L-Arg3,0%+DDS	0,2501	0,1401
L-Arg6,0%+DDS	0,1861	0,112

**Tabela 9:** Determinação dos parâmetros bioquímicos: Bilirrubina direta

<i>GRUPOS:</i>	Bilirr Direta (mg/dL)	Desvio Padrão (+/-)
DMSO	0,1383	0,1049
L-Arginina 1,5%	0,0404	0,08179
L-Arginina 3,0%	0,0369	0,03234
L-Arginina 6,0%	0,0432	0,0326
DDS 40mg/Kg	0,0981	0,09968
L-Arg1,5%+DDS	0,1058	0,1054
L-Arg3,0%+DDS	0,08	0,07188
L-Arg6,0%+DDS	0,0802	0,09714

**Tabela 10:** Determinação dos parâmetros bioquímicos: Bilirrubina indireta

<i>GRUPOS:</i>	Bilirr Indireta (mg/dL)	Desvio Padrão (+/-)
DMSO	0,2481	0,1241
L-Arginina 1,5%	0,0781	0,03028
L-Arginina 3,0%	0,3639	0,3387
L-Arginina 6,0%	0,1915	0,155
DDS 40mg/Kg	0,2489	0,05841
L-Arg1,5%+DDS	0,1904	0,1416
L-Arg3,0%+DDS	0,1299	0,07904
L-Arg6,0%+DDS	0,103	0,08994

#### 4.2.3 Determinação Hematológica

A Tabela 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 representa os valores dos Eritrócitos, Hemoglobina, Hematócrito, Índices Eritrocitométricos, Plaquetas e Leucócitos, entre os grupos que receberam DMSO, dapsona 40mg/kg e arginina 1,5%, 3,0% e 6,0% administrada 2h antes da dose de dapsona 40mg/kg.

**Tabela 11:** Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Eritrócitos

<b>GRUPOS:</b>	Eritro	DP
	milhões/mm <sup>3</sup>	(+/-)
<b>DMSO</b>	5,396	0,186
<b>L-Arginina 1,5%</b>	5,669	0,378
<b>L-Arginina 3,0%</b>	5,536	0,214
<b>L-Arginina 6,0%</b>	5,510	0,329
<b>DDS 40mg/Kg</b>	5,345	0,061
<b>L-Arg1,5%+DDS</b>	5,489	0,191
<b>L-Arg3,0%+DDS</b>	5,284	0,076
<b>L-Arg6,0%+DDS</b>	5,201	0,210

**Tabela 12:** Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Hemoglobina

<b>GRUPOS:</b>	Hb	DP
	g/100mL	(+/-)
<b>DMSO</b>	12,638	0,350
<b>L-Arginina 1,5%</b>	12,663	0,787
<b>L-Arginina 3,0%</b>	12,850	0,267
<b>L-Arginina 6,0%</b>	12,838	0,434
<b>DDS 40mg/Kg</b>	12,175	0,266
<b>L-Arg1,5%+DDS</b>	13,225 <sup>#</sup>	1,015
<b>L-Arg3,0%+DDS</b>	11,963	0,297
<b>L-Arg6,0%+DDS</b>	12,313	0,360

<sup>#</sup>Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DDS p<0,01

**Tabela 13:** Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Hematócrito

<b>GRUPOS:</b>	Ht	DP
	%	(+/-)
<b>DMSO</b>	36,163	1,196
<b>L-Arginina 1,5%</b>	37,338	2,492
<b>L-Arginina 3,0%</b>	37,300	1,124
<b>L-Arginina 6,0%</b>	36,763	1,517
<b>DDS 40mg/Kg</b>	34,463	0,484
<b>L-Arg1,5%+DDS</b>	35,963	1,859
<b>L-Arg3,0%+DDS</b>	34,100	0,878
<b>L-Arg6,0%+DDS</b>	34,525	1,529

**Tabela 14:** Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Volume Corpuscular Médio

<b>GRUPOS:</b>	VCM f1	DP (+/-)
<b>DMSO</b>	67,250	1,389
<b>L-Arginina 1,5%</b>	65,875	1,885
<b>L-Arginina 3,0%</b>	66,250	0,886
<b>L-Arginina 6,0%</b>	66,125	1,727
<b>DDS 40mg/Kg</b>	67,125	1,885
<b>L-Arg1,5%+DDS</b>	65,500	2,330
<b>L-Arg3,0%+DDS</b>	64,250*	1,832
<b>L-Arg6,0%+DDS</b>	65,625	2,066

\*Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DMSO e DDS  $p < 0,05$

**Tabela 15:** Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Hemoglobina Corpuscular Média

<b>GRUPOS:</b>	HCM pg	DP (+/-)
<b>DMSO</b>	23,450	0,729
<b>L-Arginina 1,5%</b>	22,338	0,643
<b>L-Arginina 3,0%</b>	22,725	0,495
<b>L-Arginina 6,0%</b>	22,900	0,715
<b>DDS 40mg/Kg</b>	22,963	0,524
<b>L-Arg1,5%+DDS</b>	24,113	1,720
<b>L-Arg3,0%+DDS</b>	22,588	0,666
<b>L-Arg6,0%+DDS</b>	23,463	0,689

**Tabela 16:** Determinação dos parâmetros Hematológicos - série vermelha: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

<b>GRUPOS:</b>	CHCM g/dL	DP (+/-)
<b>DMSO</b>	34,413	0,718
<b>L-Arginina 1,5%</b>	33,788	0,675
<b>L-Arginina 3,0%</b>	34,150	0,490
<b>L-Arginina 6,0%</b>	34,563	0,711
<b>DDS 40mg/Kg</b>	34,588	0,455
<b>L-Arg1,5%+DDS</b>	36,900'	2,105
<b>L-Arg3,0%+DDS</b>	34,950	0,273
<b>L-Arg6,0%+DDS</b>	35,488	0,698

'Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DMSO e DDS  $p < 0,001$

**Tabela 17:** Determinação dos parâmetros Hematológicos - série branca: Plaquetas

<b>GRUPOS:</b>	Plaquetas mm <sup>3</sup>	DP (+/-)
<b>DMSO</b>	820,63	48,538
<b>L-Arginina 1,5%</b>	678,13*	117,45
<b>L-Arginina 3,0%</b>	743,5	54,858
<b>L-Arginina 6,0%</b>	762,5	41,363
<b>DDS 40mg/Kg</b>	880,5	61,465
<b>L-Arg1,5%+DDS</b>	784,25	81,954
<b>L-Arg3,0%+DDS</b>	790,13	54,281
<b>L-Arg6,0%+DDS</b>	826,5	99,969

\*Diferença estatística significativa quando comparada ao grupo DMSO  $p < 0,01$

**Tabela 18:** Determinação dos parâmetros Hematológicos - série branca: Leucócitos

<b>GRUPOS:</b>	Leucócitos mm <sup>3</sup>	DP (+/-)
<b>DMSO</b>	3587,5	499,82
<b>L-Arginina 1,5%</b>	2912,5	1247,2
<b>L-Arginina 3,0%</b>	2562,5	680,2
<b>L-Arginina 6,0%</b>	3250	623,35
<b>DDS 40mg/Kg</b>	4587,5	1327,1
<b>L-Arg1,5%+DDS</b>	4762,5	2783,1
<b>L-Arg3,0%+DDS</b>	3137,5	1166,1
<b>L-Arg6,0%+DDS</b>	2687,5	1023,2

### 4.3 Regime de dosagem: Dose Múltipla

#### 4.3.1 Determinação da porcentagem de metemoglobina

Após tratamento com duração de 5 dias consecutivos, e o sangue colhido, a porcentagem de metemoglobina foi determinada por espectrofotometria.

A Tabela 19 e Figura 8, 9 e 10 mostram as porcentagens de metemoglobina dos grupos controle que receberam DMSO, dapsona 40mg/kg e arginina 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0%.

De acordo com valores obtidos, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de metemoglobina entre os grupos que receberam Água

Destilada e arginina 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0%, comprovando que eles não provocam hemotoxicidade.

Observou-se dentre os valores obtidos dos grupos que receberam DMSO e dapsona 40mg/kg, um aumento na porcentagem de metemoglobina, provocado pela administração de dapsona 40mg/kg.

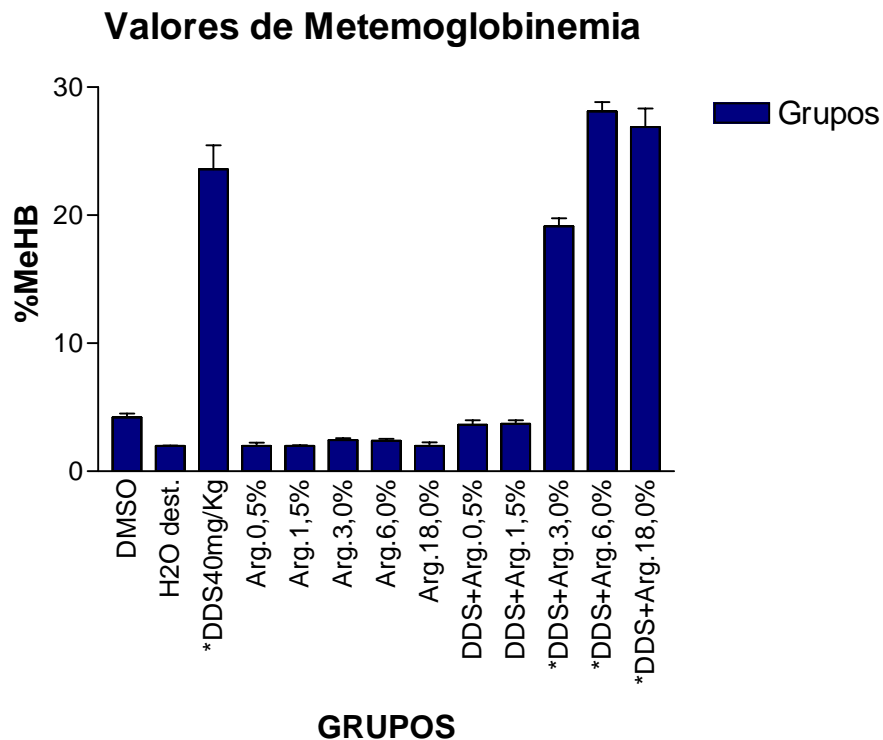
A Tabela 19 e Figura 8, 9 e 10 representam também as porcentagens de metemoglobina entre os grupos que receberam DMSO, dapsona 40mg/kg e arginina 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0% administrada 2h antes da dose de dapsona 40mg/kg.

Comparando-se os valores da porcentagem de metemoglobina entre DMSO/ H<sub>2</sub>O Destilada e DDS + arginina 3,0% 6,0% e 18,0%, observou-se uma diferença significativa com aumento do efeito tóxico ( $p < 0,001$ ) previamente à dose de dapsona 40mg/kg. Porém, comparando-se os valores da porcentagem de metemoglobina entre DMSO/ H<sub>2</sub>O Destilada e DDS + arginina 0,5% e 1,5% observou-se que entre os grupos não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) (tabela 19).

**Tabela 19: Porcentagem de metemoglobinemia em Dose Múltipla com seu desvio padrão em ratos Wistar**

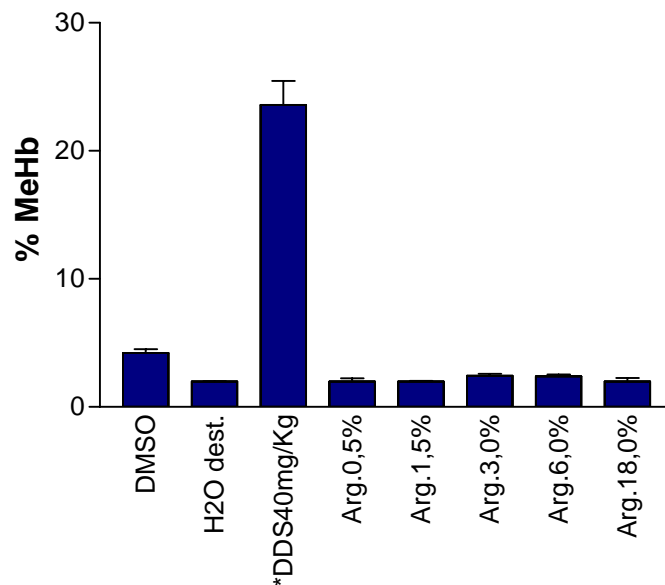
GRUPOS	Média % MeHb	SD	N
DMSO	4,22	±0,8	8
H2O Dest.	1,98	±0,07	8
DDS 40mg/Kg	23,58*	±5,34	8
Arginina 0,5%	1,99	±0,68	8
Arginina 1,5%	1,99	±0,13	8
Arginina 3,0%	2,44	±0,43	8
Arginina 6,0%	2,39	±0,43	8
Arginina 18,0%	1,99	±0,76	8
Arg.0,5% + DDS	3,63	±1,01	8
Arg.1,5% + DDS	3,71	±0,79	8
Arg.3,0% + DDS	19,15*	±1,76	8
Arg.6,0% + DDS	28,12*	±2,03	8
Arg.18,0% + DDS	26,89*	±4,06	8

\*Diferença estatística significativa quando comparada aos grupos DMSO e H<sub>2</sub>O Destilada (Água Destilada)  $p < 0,001$



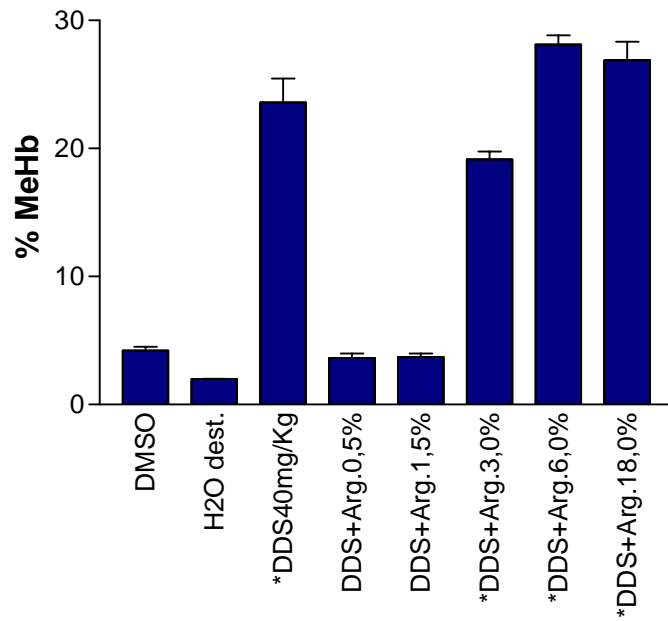
**Figura 8.** Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Múltipla em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg, Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0% e DDS 40mg/Kg + Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%

\*Diferença estatística significativa quando comparada aos grupos DMSO e H<sub>2</sub>O Destilada (Água Destilada)  $p < 0,001$



**Figura 9.** Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Múltipla em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg, Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%.

\*Diferença estatística significativa quando comparada aos grupos DMSO e H<sub>2</sub>O Destilada (Água Destilada)  $p < 0,001$



**Figura 10.** Representação gráfica dos valores de metemoglobinemia em Dose Múltipla em ratos nos grupos DMSO (controle), DDS 40mg/Kg e DDS + Arginina 0,5, 1,5, 3,0, 6,0 e 18,0%.

\*Diferença estatística significativa quando comparada aos grupos DMSO e H<sub>2</sub>O Destilada (Água Destilada)  $p < 0,001$



## **5. DISCUSSÃO**

---

---

Dapsona (4-4'-diamino-difenil sulfona), um potente composto antiinflamatório e antiparasitário, é utilizado como fármaco de escolha para o tratamento da hanseníase. Na Europa e nos Estados Unidos da América, encontra-se aplicações principalmente no tratamento de dermatoses e dermatites (SENER et al., 2006).

Este fármaco é eficaz na hanseníase por ter ação bacteriostática contra seu agente etiológico *Mycobacterium leprae*. Esta ação é causada pela inibição da síntese do ácido diidrofólico pela competição com PABA (KWADIJK, TORAÑO, 2002; ANNIGERI, METGUD, PATIL, 2007).

Os efeitos adversos mais freqüentes são metemoglobinemia e anemia hemolítica, e raramente, pode causar reação idiossincrática, chamada de Síndrome da Hipersensibilidade à dapsona (DHS) (SENER et al., 2006).

A dapsona é metabolizada 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 hidroxilados (dapsona hidroxilamina – DDS-NOH e monoacetildapsona hidroxilamina) (Figura 1) (MELLO, 2005; ROYCHOWDHURY, YAS, SVENSSON, 2007).

Os metabólitos hidroxilados são potentes oxidantes e são os que causam os efeitos adversos hematológicos, como a metemoglobinemia (KWADIJK, TORAÑO, 2002; SENNER et al., 2006).

A concentração plasmática de dapsona no plasma de ratos foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC). CLAE ou HPLC é uma técnica analítica importante, utilizada na monitorização terapêutica de fármacos. Ela pode analisar e discriminar simultaneamente fármacos e metabólitos com alta exatidão e precisão (MALFARÁ, 2000).

Segundo COLEMAN (1995), a metemoglobina decorrente da oxidação do ferro da hemoglobina por agentes químicos deve ser determinada por espectrofotometria na região do visível (635nm, pH levemente ácido). Para a análise da metemoglobina o método escolhido foi de Evelyn e Malloy (modificado por HARRINSON; JOLLOW, 1992). Para isso, submete-se o sangue heparinizado a um método diferencial onde este foi tratado com KCN e  $K_3Fe(CN)_6$ . Fazendo a leitura inicial ( $A_1$ ) do sangue, obtem-se a absorvância referente a metemoglobina e possíveis interferentes. Quando ao sangue é adicionado KCN ( $A_2$ ), a metemoglobina é convertida em cianometemoglobina e assim eliminam-se os possíveis interferentes na leitura. Ao adicionar  $K_3Fe(CN)_6$  à amostra, toda hemoglobina é convertida

em metemoglobina, medindo-se a absorvância de metemoglobina total ( $A_3$ ). Se a esta solução adicionar-se KCN, toda metemoglobina é convertida em cianometemoglobina, e tem-se a absorvância total desta ( $A_4$ ) (COLEMAN, 1995). A metemoglobina em solução fracamente ácida apresenta uma absorvância maior que a cianometemoglobina. Para evitar possíveis interferentes de compostos afins, junto ao comprimento de onda de 635 nm, adiciona-se o cianeto de potássio que converte a metemoglobina em cianometemoglobina, a qual não absorve neste comprimento de onda. Assim temos através da aplicação de um método diferencial uma análise segura. Na aplicação deste método além do pH da solução tampão o armazenamento das amostras sob refrigeração é de fundamental importância.

Em adultos sadios, o valor de referência da porcentagem de metemoglobina é de 1 a 2%, sendo que o limite biológico de exposição é de 5% (COLEMAN, 1995).

O veículo mais apropriado para a dapsona foi o dimetilsulfóxido, acarretando uma pequena variação na porcentagem de metemoglobinemia.

Na escolha da dose de DDS que melhor expressa a metemoglobinemia, escolhemos a de 40 mg/Kg, pois nas doses de 5, 10, e 20 mg/Kg a metemoglobinemia não mostrava dados reprodutíveis.

No presente trabalho, o nosso objetivo foi o de investigar a possível ação antioxidante da arginina, através do óxido nítrico, nos efeitos causados pela dapsona.

A arginina é um aminoácido semi-essencial, precursor de óxido nítrico, com potencial oxidante e antioxidante, dependendo da concentração presente no organismo.

O óxido nítrico (NO) atua de diversas maneiras como antioxidante. Primeiramente, segundo CHUANG E CHIUEH (1999), recentes resultados *in vitro* e *in vivo* indicaram que o NO é um potente agente antioxidante. O NO interfere no estresse oxidativo por vários mecanismos: I. Anulando a geração do radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) induzida pela reação com o ferro via Reação de Fenton; II. Interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica; III. Aumentando a potência antioxidante da glutatona; e, IV. Inibindo cisteína proteases.

Segundo WINK et al. (2001), o NO pode também controlar a oxidação mediada por espécies reativas de oxigênio como água oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) que ocorre em níveis fisiológicos de NO. Como antioxidante, a atenuação da oxidação do metal/peróxido, e também a atenuação da peroxidação lipídica, parece ser os principais mecanismos químicos pelo qual o NO pode limitar a lesão oxidativa, evitando a morte celular. Além dessas propriedades químicas e bioquímicas, o NO pode modular processos celulares e fisiológicos atenuando a lesão oxidativa, limitando processos como a adesão leucocitária.

O óxido nítrico também pode agir induzindo a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na parede vascular, e no exterior da célula diminuindo a concentração do radical superóxido disponível e, conseqüentemente, a produção de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). O NO também induz a síntese de ferritina, que se liga a íons ferro livres e previne a geração do ânion radical superóxido (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

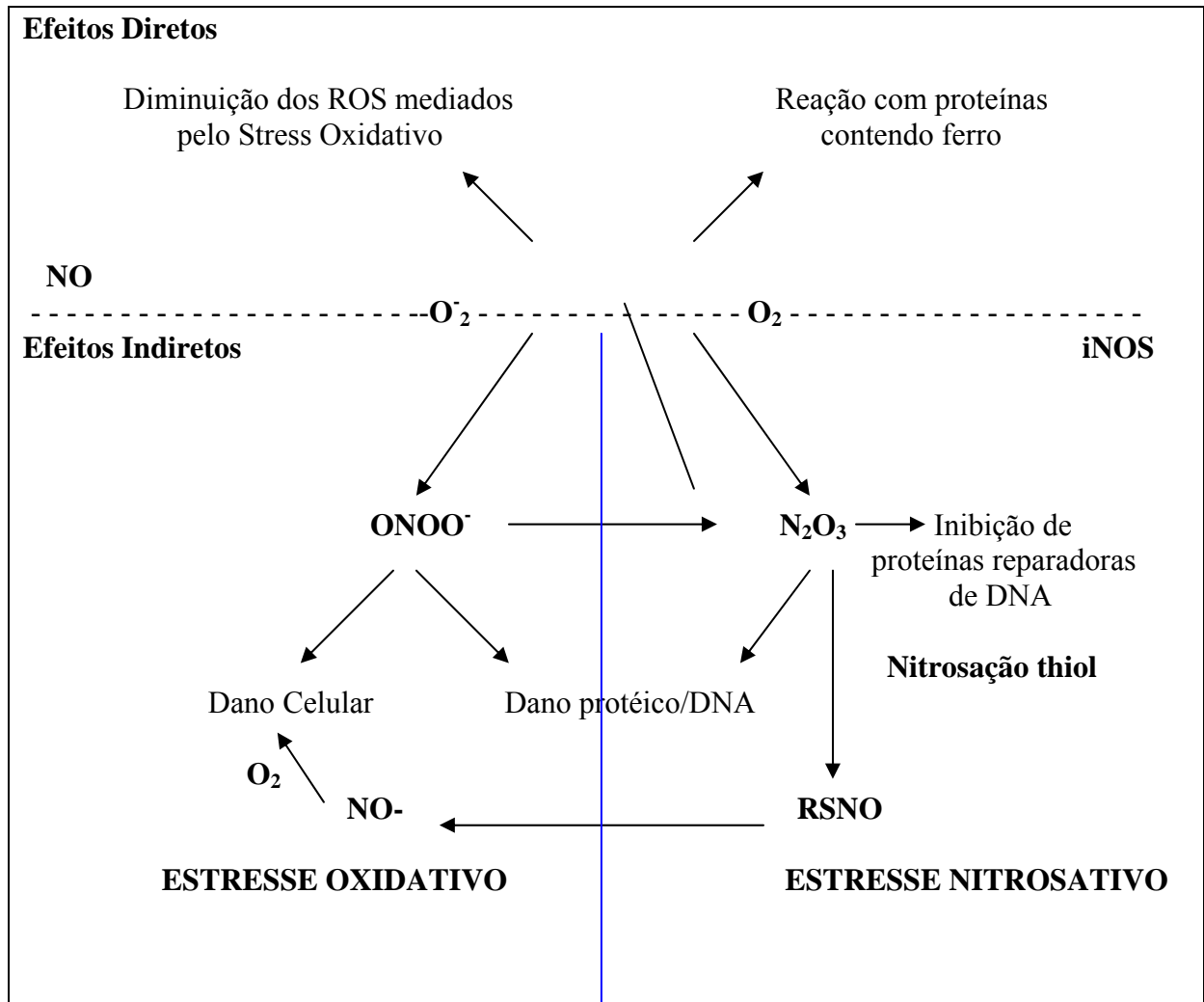
O óxido nítrico reage rapidamente com metais de transição, que tem estado de oxidação estável diferindo por um elétron. É raro quando o óxido nítrico reage com ambas as formas do ferro (ferroso e férrico). O elétron desapareado do óxido nítrico é parcialmente transferido ao metal formando uma ligação principalmente iônica (LANCASTER, 2006).

Já a ligação do óxido nítrico com o ferro no estado ferroso é reversível e ocorre com uma alta afinidade. O maior sinal celular do mecanismo de transdução do óxido nítrico é mediado pela ativação da guanilato ciclase solúvel, o qual eleva concentrações intracelulares de GMPc. Esta enzima contém o mesmo heme protoporfirina IX como a hemoglobina com o ferro na forma ferrosa (LANCASTER, 2006).

O NO se liga com alta afinidade ao ferro em grupo heme de proteínas como hemoglobina, mioglobina e guanilato ciclase (LASKIN, LASKIN, 1999).

Na tentativa de categorizar estas diversas reações em termos de sua significância biológica, foi desenvolvido o conceito de “Biologia química do Óxido Nítrico”. Este conceito separa as reações químicas dentro de duas categorias básicas de efeitos diretos e indiretos (Figura 11) (MAYER, BALLIGAND, BOGDAN, 2000).

Reações químicas diretas são definidas como aquelas em que o NO interage com alvos biológicos. A reação mais comum é entre o NO e proteínas contendo o grupo heme. Tais reações são geralmente rápidas, requerendo baixas concentrações de NO e assim esclarecendo provavelmente a maioria dos efeitos fisiológicos do NO. Inversamente, os efeitos indiretos envolvem as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RNOS) derivados a partir da reação entre NO e  $\text{O}_2$  ou  $\text{O}_2^-$ . Estes RNOS podem reagir com moléculas intracelulares críticas e modulá-las. Os reativos intermediários que são responsáveis pelos efeitos indiretos do NO podem submeter-se à várias reações químicas que resultam em estresse oxidativo ou nitrosativo, dependendo da espécie envolvida (MAYER, BALLIGAND, BOGDAN, 2000).



**Figura 11.** Reatividade química na biologia química do Óxido Nítrico (MAYER, BALLIGAND, BOGDAN, 2000).

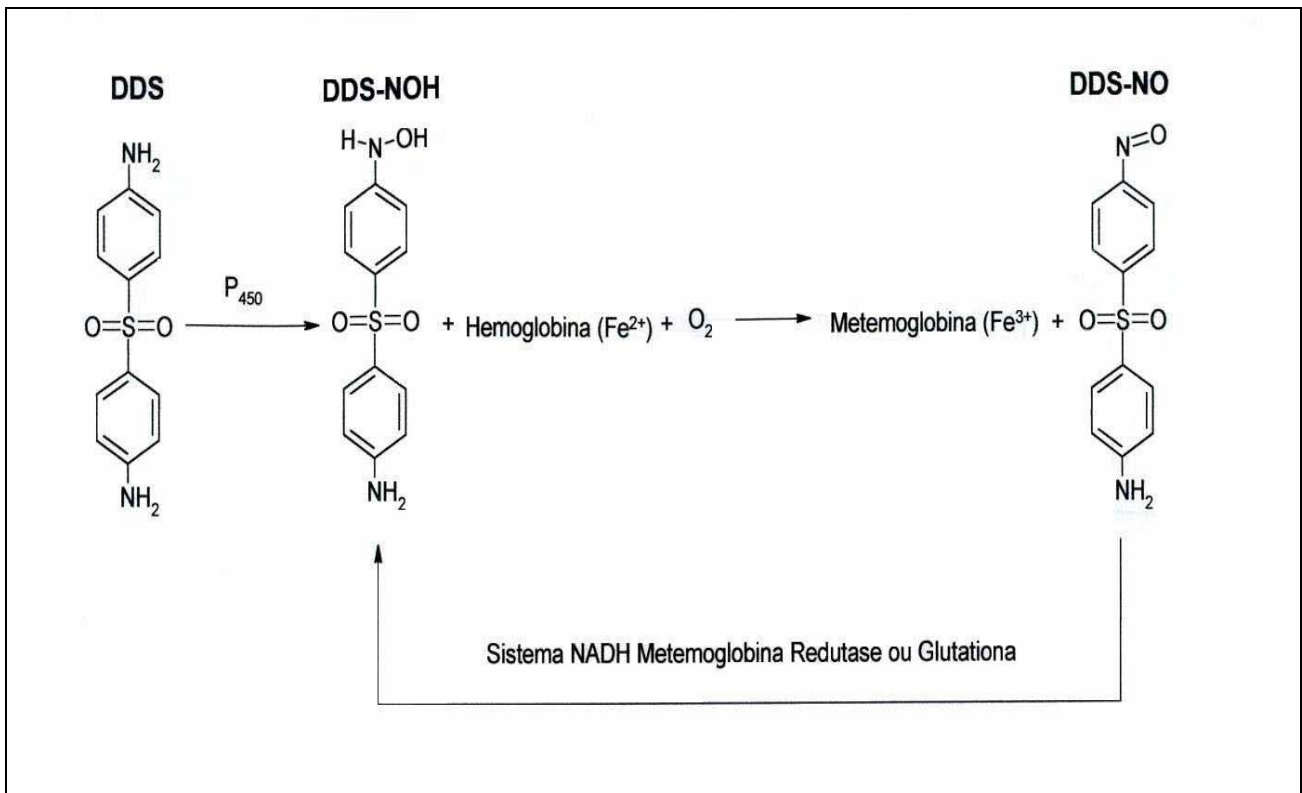
A separação das reações químicas dentro dos efeitos direto e indireto é análoga ao conceito das isoenzimas constitutiva e indutível do óxido nítrico sintetase. O NOS expressada constitutivamente é gerada em pequenas quantidades. No entanto, a NOS indutível gera NO por períodos prolongados de tempo. Por isso, em geral, o tipo de isoenzima ordenará a química e o resultado final biológico da produção de NO. Em consideração adicional é a proximidade do alvo biológico a fonte de NO (MAYER, BALLIGAND, BOGDAN, 2000).

Ao contrário da ativação da guanilato ciclase, o NO inibe o citocromo P450 além de outros heme monooxigenases. A inibição do citocromo P450 no fígado inibe o metabolismo de fármacos. No entanto, a ligação do NO com o heme do citocromo P450 pode resultar na liberação do heme livre, no qual por sua vez ativa o heme oxigenase em hepatócitos. A ativação do heme oxigenase pode servir como mecanismo protetor contra uma variedade de condições patofisiológicas. Então, a interação do NO com o P450 pode envolver funções

fisiológicas regulatórias e produzir efeitos patofisiológicos positivos ou negativos (MAYER, BALLIGAND, BOGDAN, 2000).

Um estudo mais criterioso em relação ao metabolismo da DDS nos trouxe alguns esclarecimentos sobre outras possíveis vias metabólicas de seus derivados hidroxilados.

A dapsona hidroxilamina reage com a oxiemoglobina ( $\text{Fe}^{2+}$ ), para formar a metemoglobinemia ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e um nitrosobenzeno, que por sua vez é reduzido novamente até dapsona hidroxilamina, pela NADH metemoglobina redutase; e pela glutatona também. Esta hidroxilamina reage então com outra molécula de oxiemoglobina, continuando assim o ciclo redox. Cada molécula de hidroxilamina é capaz de oxidar até cinco moléculas de oxiemoglobina, e o ciclo somente cessa quando a glutatona eritrocitária está quase completamente depletada (KRAMER; GLADER; LI, 1972; MELLO, 2005)



**Figura 12.** 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<sub>450</sub> = Citocromo P<sub>450</sub>

No entanto, de acordo com o ciclo redox da dapsona e o mecanismo antioxidante do óxido nítrico, podemos concluir que este último age reagindo com o ferro da hemoglobina, não deixando que a DDS-NOH se ligue à esta molécula, inibindo assim a produção da metemoglobina (Figura 12).

Em um trabalho realizado por WU E CEDERBAUM, 2006, o NO diminuiu a toxicidade do ácido araquidônico, agindo como antioxidante, prevenindo a peroxidação lipídica e restaurando os níveis de glutathione.

O NO pode inibir a atividade de várias enzimas do citocromo P450. Ele e seus produtos podem também modificar as funções das proteínas (WU; CEDERBAUM, 2006).

O NO pode se ligar ao heme de proteínas tal como o citocromo P450 e modificar a função delas. O NO compete com o  $O_2$  pela ligação à enzima do citocromo P450, fornecendo um mecanismo pelo qual o óxido nítrico inibe a atividade do citocromo P450 (WU; CEDERBAUM, 2006).

Ele exerce efeitos de proteção sobre os hepatócitos e dano tecidual, atuando contra o dano oxidativo e peroxidação lipídica. Um dos mecanismos da proteção é a regulação do heme oxigenase-1 (WU; CEDERBAUM, 2006).

A concentração e a fonte de NO, são os maiores fatores que determinam seus efeitos biológicos. Em baixas concentrações ( $<1\mu M$ ), os efeitos antioxidativos do NO predominam. Em concentrações maiores ( $>1\mu M$ ), os efeitos oxidativos mediados pelas espécies reativas de nitrogênio prevalecem. Assim, em tipos celulares que contém isoforma cNOS, o NO é produzido em quantidade relativamente baixa por períodos curtos de tempo e provoca principalmente efeitos diretos, ou seja, antioxidantes. Quando a iNOS é induzida, altas concentrações de NO são produzidas, e os efeitos indiretos, os oxidantes, freqüentemente patológicos são exibidos (DAVIS et al., 2001).

Os efeitos antioxidantes do NO muito freqüentemente envolvem a interação do NO com metais. O NO pode também interagir diretamente com metais de transição. A reação do NO com proteínas que contém o heme são as mais relevantes fisiologicamente e incluem interações com o guanilato ciclase solúvel e o citocromo P450.

Os efeitos oxidantes do NO, produzidos através da interação do NO com cada  $O_2$  ou  $O_2^-$ , incluindo nitrosação (quando o NO é adicionado a uma amina, tiol, ou grupo aromático hidroxil), oxidação (quando um ou dois elétrons são removidos a partir do substrato), ou nitração (quando o  $NO_2^+$  é adicionado a uma molécula). Em soluções aquosas, o NO pode sofrer auto-oxidação (reação com  $O_2$ ) para produzir  $N_2O_3$ ; este componente pode sofrer hidrólise para formar nitrito (DAVIS et al., 2001).

O ferro é o mais abundante metal de transição no sistema biológico. Não surpreendentemente, investigadores têm dado muita atenção para esta interação de NO com o ferro e à função biológica desta interação. A geometria do heme determina o caráter da interação NO-heme. Como regra, o NO não interage eficientemente com a sexta-coordenada heme e tem um efeito limitado sobre a função destas proteínas. O caráter e o resultado da interação do NO com o ferro depende de vários fatores, incluindo o estado de oxidação do ferro (ferroso ou férrico), o meio ambiente na ligação com o heme (resíduos circulantes do grupo prostético), e a disponibilidade do oxigênio ou outras espécies radicalares.

A guanilato ciclase solúvel (sGC) é uma hemoproteína heterodimérica que converte GTP em GMP cíclico e pirofosfato. A enzima tem alguma atividade basal quando inativada, mas é ativada pela interação do ferro no estado ferroso do grupo heme da enzima com o NO. A sGC é ativada pelo NO em baixas concentrações. A concentração efetiva baixa do NO, no caso do sGC, reflete a alta afinidade do NO pelo grupo heme da sGC. A taxa da ligação do NO-heme pelo sGC é um tanto rápida, qual é na mesma escala a ligação proteína-heme-ferro (ferroso). A geometria da ligação do NO com o ferro do heme é igual à ligação com o oxigênio (DAVIS et al., 2001).

Desta forma, embasados pela literatura apostando neste poder antioxidante da arginina e visando a obtenção de uma possível hemoproteção, escolhemos parâmetros objetivos para esta avaliação. Assim, a metodologia foi estabelecida para a determinação de metemoglobinemia, hemograma completo, reticulócitos, haptoglobina, bilirrubinas e desidrogenase láctica.

Após o estudo de dose da DDS, iniciamos o estudo com a arginina nas concentrações de 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18% em dose única, administrando a arginina duas horas antes da dapsona.

Em relação aos resultados do estudo em dose única a porcentagem dos valores de metemoglobina (Tabela 6 e Figura 5, 6 e 7) foi verificado que os grupos de arginina nas concentrações 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0% causaram metemoglobinemia, demonstrando que eles por si só acarretaram uma baixa concentração de metemoglobinemia quando comparados com a administração de água destilada. O efeito metemoglobinizante da arginina se mostrou dose-dependente, pois na concentração de 0,5% ( $0,65 \pm 0,33$ ), o resultado encontrado foi semelhante ao de administração de água destilada ( $0,67 \pm 0,33$ ).

Foi também representada a porcentagem de metemoglobina entre os grupos que receberam DMSO, dapsona 40mg/kg e arginina 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0% administrada 2h antes da dose de dapsona 40mg/kg. Comparando-se os valores da



porcentagem de metemoglobina entre dapsona (DDS) e DDS + arginina 0,5% administrada 2h antes da dose de dapsona, observou-se um aumento significativo de metemoglobina ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle DDS. Comparando-se os valores da porcentagem de metemoglobina entre dapsona (DDS) e DDS + arginina 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18 % administrada 2h antes da dose de dapsona, observou-se um aumento significativo de metemoglobina ( $p < 0,001$ ).

Desta forma, a administração concomitante de arginina 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0%, com a dapsona, não apresentou efeito protetor na ação da dapsona sobre o sistema hematológico; e os grupos DDS + arginina 0,5%, 1,5%, 3,0% e 18,0% mostraram uma adição de efeitos sobre os valores de metemoglobina.

A hipótese para estes resultados foi que a DDS + arginina nas concentrações de 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0% em dose única favoreceram o ciclo redox aumentando a produção dos metabólitos hidroxilados (monoacetildapsona hidroxilamina e dapsona hidroxilamina) e assim aumentando também a metemoglobina.

Imaginamos, com os resultados, que desta forma poderia estar se comportando como um pró-oxidante, pois ao invés de proteger, estava ocorrendo um efeito de adição sobre os valores de metemoglobinemia.

Assim, começamos a fazer dose múltipla com as mesmas concentrações de arginina, administrando a arginina durante 5 dias consecutivos e no 5º dia administrando a dapsona duas horas depois da arginina.

E com esses resultados vieram o esperado. Na administração da dapsona com a arginina 0,5% e 1,5% em dose múltipla ocorreu a prevenção da metemoglobinemia (Tabela 19 e Figura 8, 9, e 10), pois seus valores se mostraram iguais aos valores do grupo controle.

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. Por isso, analisamos parâmetros bioquímicos (Desidrogenase Láctica, Bilirrubina Total, Bilirrubina Direta e Bilirrubina Indireta) e hematológicos (Eritrócitos, Hemoglobina, Hematócrito, Índices Eritrocitométricos, Plaquetas e Leucócitos) para medir tais danos.

A enzima desidrogenase láctica (LDH) está presente em muitos tecidos, especialmente no coração, fígado, rins, músculos do esqueleto, células sanguíneas do cérebro e pulmões. A LDH cataliza a interconversão de piruvato e lactato. Músculo que se exercitam

convertem (e os glóbulos vermelhos metabolizam) glicose em lactato. O lactato é liberado no sangue e eventualmente absorvido pelo fígado. O fígado converte lactato de volta em glicose e libera glicose no sangue. Essa glicose é então absorvida pelos músculos em repouso, glóbulos vermelhos e por outros tecidos.

A medição do LDH é mais utilizada para avaliar a presença de tecidos danificados. 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. Nessa análise, não houve resultado significativo.

O metabolismo da bilirrubina começa com a decomposição de glóbulos vermelhos por células fagocíticas. A hemoglobina é decomposta em heme e globina. O heme é convertido em bilirrubina, que é então transportada pela albumina no sangue até o fígado. No fígado, a maior parte da bilirrubina é conjugada (anexada quimicamente) a uma glucuronida antes de ser excretada na bile. A bilirrubina conjugada é chamada de bilirrubina direta; a bilirrubina não-conjugada é chamada de bilirrubina indireta. A bilirrubina total do soro é igual à bilirrubina direta mais a bilirrubina indireta. A bilirrubina conjugada é excretada na bile pelo fígado e estocada na vesícula biliar ou transferida diretamente ao intestino delgado.

Este exame é útil para determinar alguma doença hepática ou ducto biliar bloqueado. A determinação da bilirrubina em amostras de sangue é útil, portanto, na avaliação de doenças hematológicas, como anemia hemolítica, que cursam com alteração no metabolismo da bilirrubina; não havendo também nenhum resultado significativo.

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

Os índices eritrocitométricos são úteis para caracterizar os tipos de anemia. Em casos de anemia ocorre níveis diminuídos do volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração da hemoglobina corpuscular média.

A contagem de eritrócitos é fator importante na determinação de quadros de anemia hemolítica.

Nesses valores, nenhum dos dados demonstraram resultado significativo.

Desta forma, as análises bioquímicas e hematológicas realizadas na dose única e dose múltipla, não apresentaram resultados significativos.

Neste contexto, os dados observados no presente estudo permitiram evidenciar que a arginina quando administrada em doses múltiplas nas concentrações de 0,5 a 1,5% previne a hemotoxicidade da dapsona em ratos Wistar; assim o trabalho contribuiu na melhora de qualidade de vida de pacientes na terapêutica com a dapsona, minimizando seus efeitos adversos.

## **6. CONCLUSÃO**

---

---

O presente trabalho teve como objetivo analisar a inibição da metemoglobinemia induzida pela dapsona em ratos.

De acordo com este estudo, utilizamos 130 ratos em dose única e 130 ratos em dose múltipla, num total de 260 ratos, podendo assim concluir:

- Os testes bioquímicos e hematológicos realizados não apresentaram nenhum resultado significativo. Na análise feita, os resultados obtidos não mostraram nenhuma alteração estatística significativa, e assim, não demonstrou a anemia hemolítica.
- O efeito oxidativo da dapsona foi dose/dependente tanto em regime de dose única quanto em dose múltipla.
- A partir de estudos, avaliando dados experimentais em ratos, constatamos que a dose ideal para a verificação da metemoglobina foi de 40 mg/Kg de dapsona.
- Em relação à arginina utilizada isoladamente, esta nas concentrações de 1,5% a 18% induzir a formação de metemoglobinemia em ratos Wistar, tanto em regime de dose única, quanto de dose múltipla, demonstrando um efeito metemoglobinizante dose dependente.
- Em dose única, quando a arginina foi administrada nas concentrações de 0,5%, 1,5%, 3,0%, 6,0% e 18,0% duas horas antes da dapsona estas não apresentaram proteção contra a hemotoxicidade causada pela dapsona, mostrando que houve um efeito de adição sobre os valores de metemoglobina.
- No entanto, em dose múltipla, a arginina quando administrada nas concentrações de 0,5% e 1,5%, duas horas antes da dapsona, demonstrou prevenir o efeito metemoglobinizante da dapsona, pois conseguiram diminuir e estabilizar os valores de metemoglobinemia, justamente por suas concentrações serem menores que 1 $\mu$ M. Já a arginina quando administrada nas concentrações de 3,0%, 6,0% e 18,0% se mostraram sem proteção, pois os valores de metemoglobinemia se mostraram elevados, iguais à administração da dapsona isolada, devido às suas concentrações serem maiores que 1 $\mu$ M.

## **REFERÊNCIAS**

---

---

1. ARAÚJO, M. G. Leprosy in Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 3, p. 373-82, 2003.
2. ANNIGERI, S.R.; METGUD, S.C.; PATIL, J.R. Lepromatous leprosy of histoid type. **Indian J Med Microbiol.** Volume: 25, Edição: 1, 2007 Jan.
3. BASIVIREDDY, J.; JACOB, M.; PULIMOOD, A. B.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Indomethacin-induced renal damage: role of oxygen free radicals. **Biochem. Pharmacol.**, Índia, v. 67, p. 587-99, 2004.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. DGPE. **Hanseníase no Brasil: progressos e dificuldades em relação à eliminação.** Brasília, 1998.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. DGPE. **Guia para implantar/implementar as atividades de controle da hanseníase nos planos estaduais e municipais de saúde.** Brasília, 1999.
6. BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase.** Brasília, 2006.
7. 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.
8. CAMBAU, E.; PERANI, E.; GUILLEMIN, I.; JAMET, P.; JI, B. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. **Lancet**, Paris, v. 349, p. 103-4, 1997.
9. CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 6, p.417-423, nov.-dez. 2002.

10. CHALASANI, P.; BAFFOE-BONNIE, H.; JURADO, R. L. Dapsone therapy causing sulfone syndrome and lethal hepatic failure in a HIV-infected patient. **South Med. J.**, v. 87, n. 11, p. 1145-6, 1994.
11. CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1996.
12. CHUANG, C.; CHIUE, H. Neuroprotective properties of nitric oxide. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 890, p. 301, 1999.
13. COLEMAN, M. D. Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. **Br. J. Dermatol.**, UK, v. 129, p. 507-13, 1993.
14. COLEMAN, M. D. Dapsone toxicity: some current perspectives. **Gen. Pharmacol.**, UK, v. 26, n. 7, p. 1461-7, 1995.
15. 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.
16. DAVIS, K.L.; MARTIN, E.; TURKO, I.V.; MURAD, F. Novel effects of Nitric Oxide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.41, p.203-36, 2001.
17. DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1998.
18. DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, Germany, v. 82, p. 47-95, 2002.
19. DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 343-50, 2003.
20. DUSTING, G. J.; MACDONALD, P. S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Ann. Med.**, v. 27, p. 395-406, 1995.



21. EVANS, R. G.; FITZGERALD, S. M. Nitric oxide and superoxide in the renal medulla: a delicate balancing act. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, London, v. 14, n. 1, p. 9-15, Jan. 2005.
22. FERNÍCOLA, N. G. G.; AZEVEDO, F. A. Metemoglobinemia e nitrato nas águas. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 15, p. 242-8, 1981.
23. FIMLS, A. S. A combined theoretical & technical approach. **Hematology**, p. 423, 1989.
24. GALRÃO, L.; REALE, J.; LIMA, I.; SANTIAGO, M. Efficacy of dapsone in two cases of amyopathic dermatomyositis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81, n. 2, p. 181-2, 2006.
25. GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovasc. Res.**, Germany, v. 55, p. 250-60, 2002.
26. GOULART, I. M. B.; ARBEX, G. L.; CARNEIRO, M. H.; RODRIGUES, M. S.; GADIA, R. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 35, n. 5, p. 453-60, set. - out. 2002.
27. GROSSMAN, S. J.; JOLLOW, D. J. Role of dapsone hydroxylamine in dapsone induced hemolytic anemia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Charleston, v. 244, n. 1, p. 118-25, 1988.
28. 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.**, Charleston, v. 117, p. 208-17, 1992 .
29. 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.

30. HOCHSTEIN, P. Perspectives on hydrogen peroxide and drug-induced hemolytic anemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Free Radic. Biol. Med.**, Los Angeles, v. 5, p. 387-92, 1988 .
31. KNOBEL, E. Óxido nítrico e sepse. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 67, n. 4, p. 263-66, 1996.
32. KRAMER, P. A.; GLADER, B. E.; LI, T. K. Mechanism of methemoglobin formation by diphenylsulfones. **Biochem. Pharmacol.**, Washington , v. 21, p. 1265-74, 1972.
33. KUSTNER, E. C.; CRUZ, M. P.; DANSIS, C. P.; IGLESIAS, H. V.; CAMPILLO, E. R. R.; LÓPEZ, J. L. Lepromatous leprosy: a review and case report. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, Barcelona, v. 11, p. E474-9, 2006.
34. KWADIJK, S.; TORAÑO, J. S. High-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of dapsone and its hydroxylated metabolite in human plasma. **Biomed. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 16, p. 203-8, 2002.
35. LANDERS, D.; BERGIN, C.; O' LEARY, A.; MERRY, C.; KEATING, S.; MULCAHY, F. Dapsone induced methaemoglobinaemia. **Int. J. STD AIDS**, v. 7, n. 6, p. 445-7, 1996.
36. LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. Tradução W. R. Lodi, A. A. Simões. São Paulo: Sarvier, 1986. 725 p.
37. LEITE H. P.; SARNI R. S. Artigo de revisão: Free radicals, antioxidants and nutrition. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
38. 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.
39. MALFARÁ, W. R.; PEREIRA, C. P.; GONÇALVES, P. V. B.; RODRIGUES, T.; SANTOS, A. C.; QUEIROZ, R. H. C. Efeito hemoprotetor da cimetidina na metemoglobinemia induzida pela dapsona em regime de dose única em ratos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 2, p. 219-25, 2000.

40. MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, Ann Arbor, v. 78, p. 927-30, 1994.
41. MAXWELL, A. J. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. **Nitric Oxide.**, v. 6, n. 2, p. 101-24, 2002.
42. MCALLISTER, R. M.; LAUGHLIN, M. H. Vascular nitric oxide: effects of physical activity, -importance for health. **Essays Biochem.**, Columbia, v. 42, p. 119-31, 2006.
43. MELLO, M. H. **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.
44. MIRANDA, L. E. C.; VIARO, F.; CENEVIVA, R.; EVORA, P.R.B. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. **Acta Cir. Bras.**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 1, p. 03-12, 2004.
45. MIZIARA, I. D.; GONCLIM, M.; MINITI, A. Uso da Dapsona no tratamento da estomatite aftóide recidivante. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 96-8, 1992.
46. MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS E. A.; Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, London, v. 43, p. 109-42, 1991.
47. NOVAES, M. R. C. G.; BEAL, F. L. R. Farmacologia da L-arginina em pacientes com câncer. **Rev. Bras. Cancerol.**, Brasília, v. 50, n. 4, p. 321-5, 2004.
48. OGA, S. **Fundamentos de toxicologia.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 165-9.
49. ORTIZ, P. A.; HONG, N. J.; WANG, D.; GARVIN, J. L. Gene transfer of eNOS to the thick ascending limb of eNOS-KO mice restores the effects of L-Arginine on NaCl absorption. **Hypertension**, Detroit, v. 42, p. 674-9, 2003.

50. 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.
51. QUEIROZ, R. H. C.; MELCHIOR JUNIOR, 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.**, Ribeirão Preto, v. 72, n. 4, p. 209-13, 1997.
52. RADOMSKI, M.W. ; PALMER, R.M. ; MONCADA, S. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Kent, v. 87, p. 5193-7, 1990.
53. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p.
54. RANQUE, B.; NGUYEN, V. T.; VU, H. T.; NGUYEN, T. H.; NGUYEN, N. B.; PHAM, X. K.; SCHURR, E.; ABEL, L.; ALCAIS, A. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. **Clin. Infect. Dis.**, Paris, v. 44, n. 1, p. 33-40, 2007.
55. REES, D.D.; PALMER, R.M.; SCHULZ, R.; HODSON, H.F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, Kent, v. 101, p. 746-52, 1990.
56. 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.
57. ROSSELI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Hum. Reprod. Update**, Zurich, v. 4, p. 3-24, 1998.
58. ROYCHOWDHURY, S.; YAS, P.M.; SVENSSON, C.K. Formation and uptake of arylhydroxylamine-haptenated proteins in human dendritic cells. **Drug Metab Dispos (Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals)**. Volume: 35, Edição: 4, P. 676-81, 2007 Apr.

59. SALAMAT, A.; WATSON, H. G. Drug-induced methemoglobinaemia presenting with angina follow the use of dapsona. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 25, n. 5, p. 327-8, 2003.
60. SATO, E. I.; TREVISANI, V. F. M.; FURTADO, R.; FALCÃO, E. D. Dapsone use in refractory cutaneous lesions in systemic lupus erythematosus. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 129-132, maio/jun. 1997.
61. SENER, O.; DOGANCI, L.; SAFALI, M.; BESIRBELLIOGLU, B.; BULUCU, F.; PAHSA, A. Severe dapsona hypersensitivity syndrome. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, Turkey, v. 16, n. 4, p. 268-70, 2006.
62. SILVA, S. Y.; RUEDA, L. C.; LÓPEZ, M.; VÉLEZ, I. D.; RUEDA-CLAUSEN, C. F.; SMITH, D. J.; MUÑOZ, G.; MOSQUERA, H.; SILVA, F. A.; BUITRAGO, A.; DÍAZ, H.; LÓPEZ-JARAMILLO, P. Double blind, randomized controlled trial, to evaluate the effectiveness of a controlled nitric oxide releasing patch versus meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Trials**, Colombia, v. 7, p. 14, 2006.
63. SIMS FH, HORN C. Some observations on Powell's methods for the determination of serum bilirubin. **American Journal of Clinical Pathology**. 29:412-417, 1958.
64. SINGH, H.; PURNELL, E. T. Aniline derivative-induced methemoglobin in rats. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, Georgia, v. 24, n. 1, p. 57-65, 2005.
65. TALARICO, J. F.; METRO, D. G. Presentation of dapsona-induced methemoglobinemia in a patient status post small bowel transplant. **J. Clin. Anesth.**, Pittsburgh, v. 17, p. 568-70, 2005.
66. 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 dapsona hydroxylamine. **Free Radic. Biol. Med.**, Charleston, v. 22, n. 7, p. 1183-93, 1997.
67. TINGLE, M. D.; COLEMAN, M. D.; PARK, B. K. An investigation of the role of metabolism in dapsona-induced methaemoglobinaemia using a two compartment in vitro test system. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Liverpool, v. 30, n. 6, p. 829-38, 1990.

68. WARD, K. E.; McCARTHY, M. W. Dapsone-induced methemoglobinemia. **Ann. Pharmacother.**, Pittsburgh, v. 32, n. 5, p. 549-53, 1998.
69. WINK, D. A.; MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; PLUTA, R. M.; HEWETT, S. J.; COLTON, C.; VITEK, M.; FEELISC, M.; GRISHAM, M. B. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 3, n. 2, p. 203-13, 2001.
70. WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Valhalla, v. 20, p. 1430-42, 2000.
71. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy situation, 2004. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, Genebra, v. 80, n. 13, p. 118-24, 2005.
72. WU, D.; CEDERBAUM, A. Nitric oxide donors prevent while the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME increases arachidonic acid plus CYP2E1-dependent toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. New York, 2006.
73. YAMAMOTO, G. I.; ALVES, A. A.; PICON, P. D. Propriedades anti-aterogênicas do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico). **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 69, n. 5, nov. 1997.

## APÊNDICES

---

**REGIME DE DOSAGEM: DOSE ÚNICA****Tabela 11. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DMSO**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	3,19
2	3,53
3	4,13
4	3,77
5	3,58
6	4,03
7	3,42
8	4,51
Média ± SD	3,77 ± 0,4305

**Tabela 12. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Água Destilada**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	2,09
2	1,91
3	1,59
4	1,57
5	2,01
6	2,45
7	1,44
8	1,92
Média ± SD	1,87 ± 0,3299

**Tabela 13. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS 40mg/Kg**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	14,81
2	18,12
3	18,58
4	19,1
5	18,58
6	15,33
7	17,45
8	15,51
Média ± SD	17,18 ± 1,707



**Tabela 14. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 0,5%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	1,81
2	1,74
3	1,69
4	1,61
5	1,70
6	1,84
7	1,62
8	1,60
Média ± SD	1,70 ± 0,091

**Tabela 15. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 1,5%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	1,75
2	1,73
3	1,89
4	1,87
5	1,74
6	1,73
7	1,83
8	1,94
Média ± SD	1,81 ± 0,083

**Tabela 16. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 3,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	1,59
2	1,62
3	1,66
4	1,57
5	1,51
6	1,63
7	1,55
8	1,60
Média ± SD	1,59 ± 0,047

**Tabela 17. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 6,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	1,94
2	1,81
3	1,99
4	2,01
5	2,05
6	1,89
7	1,99
8	1,96
Média ± SD	1,95 ± 0,075

**Tabela 18. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 18,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	1,94
2	1,62
3	1,85
4	2,01
5	1,79
6	2,68
7	1,83
8	2,49
Média ± SD	2,03 ± 0,367

**Tabela 19. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 0,5%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	18,58
2	19,89
3	22,56
4	24,47
5	25,23
6	23,53
7	18,03
8	22,34
Média ± SD	21,83 ± 2,699

**Tabela 20. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 1,5%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	19,88
2	32,30
3	18,76
4	23,40
5	19,35
6	27,09
7	27,89
8	27,25
Média ± SD	24,49 ± 4,908

**Tabela 21. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 3,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	25,79
2	23,22
3	24,77
4	25,63
5	24,48
6	26,73
7	21,25
8	25,97
Média ± SD	24,73 ± 1,770

**Tabela 22. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 6,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	25,66
2	22,99
3	19,41
4	26,60
5	19,78
6	23,75
7	20,49
8	18,87
Média ± SD	22,19 ± 2,976

**Tabela 23. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 18,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	21,04
2	21,05
3	24,66
4	21,53
5	19,02
6	28,39
7	29,65
8	26,76
Média ± SD	24,01 ± 3,921

**REGIME DE DOSAGEM: DOSE MÚLTIPLA****Tabela 24. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DMSO**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	4,13
2	4,28
3	4,27
4	4,91
5	2,75
6	4,99
7	3,41
8	5,00
Média ± SD	4,22 ± 0,802

**Tabela 25. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Água Destilada**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	2,09
2	1,99
3	1,85
4	2,03
5	2,01
6	1,97
7	2,00
8	1,92
Média ± SD	1,98 ± 0,072

**Tabela 26. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS 40mg/Kg**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	16,41
2	28,17
3	28,44
4	16,32
5	24,54
6	27,13
7	28,15
8	19,50
Média ± SD	23,58 ± 5,343

**Tabela 27. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 0,5%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	1,66
2	2,98
3	2,84
4	1,94
5	1,25
6	1,81
7	1,14
8	2,31
Média ± SD	1,99 ± 0,678

**Tabela 28. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 1,5%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	2,20
2	2,03
3	1,99
4	1,92
5	2,00
6	1,87
7	1,79
8	2,11
Média ± SD	1,99 ± 0,131

**Tabela 29. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 3,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	2,56
2	2,55
3	2,57
4	2,96
5	1,76
6	2,94
7	1,94
8	2,21
Média ± SD	2,44 ± 0,436

**Tabela 30. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 6,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	3,14
2	2,34
3	2,60
4	2,51
5	2,59
6	1,69
7	2,17
8	2,06
Média ± SD	2,39 ± 0,433

**Tabela 31. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com Arginina 18,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	3,69
2	1,25
3	2,12
4	1,47
5	2,27
6	1,83
7	1,67
8	1,62
Média ± SD	1,99 ± 0,762

**Tabela 32. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 0,5%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	4,70
2	4,33
3	3,15
4	2,33
5	2,49
6	2,92
7	4,42
8	4,69
Média ± SD	3,63 ± 1,008

**Tabela 33. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 1,5%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	3,44
2	2,55
3	4,70
4	3,61
5	4,87
6	2,92
7	3,79
8	3,77
Média ± SD	3,71 ± 0,792

**Tabela 34. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 3,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	23,27
2	19,30
3	18,60
4	18,20
5	19,36
6	17,88
7	18,67
8	17,91
Média ± SD	19,15 ± 1,758

**Tabela 35. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 6,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	30,25
2	29,50
3	24,06
4	29,34
5	28,50
6	26,50
7	27,50
8	29,31
Média ± SD	28,12 ± 2,035

**Tabela 36. Porcentagem de metemoglobina encontrada em ratos tratados com DDS+Arginina 18,0%**

RATOS	% METEMOGLOBINA
1	24,86
2	19,46
3	30,08
4	33,60
5	27,00
6	27,37
7	26,07
8	26,65
Média ± SD	26,89 ± 4,062