

## ANEXO I

Informar e-mail e/ou local para inscrição: [bhrunoquadros10@gmail.com](mailto:bhrunoquadros10@gmail.com)

TEMA:	O estresse oxidativo induzido pela poliquimioterapia e alterações neurológicas na hanseníase: Métodos de avaliação laboratorial em Bioquímica oxidativa.
Nº DE VAGAS:	08
PERÍODO:	26 a 27 de novembro de 2018
DIAS DA SEMANA:	Segunda e terça-feira
HORÁRIO:	14 as 18h
LOCAL DO CURSO:	LABEIM - Faculdade de Farmácia
DATA:	26 a 27 de novembro de 2018
MINISTRANTE:	Bruno Alexandre Quadros Gomes

### JUSTIFICATIVA DO TEMA:

A hanseníase é uma infecção crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, uma bactéria intracelular obrigatória, que infecta macrófagos e células de Schwann (Scollard, *et al.* 2016). A hanseníase é um grande problema de saúde pública em países tropicais, como Brasil e Índia, por muitas décadas, se não tratada, podendo levar a deficiências físicas, psicológicas e sociais ao longo da vida. As tendências globais mostram um aumento de 211.973 em 2015 para 214.783 novos casos em 2016 (WHO, 2017).

A patogênese da hanseníase tem sido influenciada por vários fatores, como o estresse oxidativo, ocasionado pela elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). No entanto, as ERO, além de destruir bactérias, também podem causar lesões a macromoléculas do hospedeiro, levando a peroxidação lipídica, hemólise, agressão aos nervos periféricos, neuroinflamação e morte neuronal (Vasconcelos, 2007).

Durante a infecção pelo *M. leprae*, principalmente pelo trato respiratório superior, macrófagos e células de Schwann são os principais alvos para a infecção no hospedeiro. Os macrófagos são um dos principais mecanismos de defesa da resposta inata do hospedeiro contra a infecção microbiana, envolvendo ativação do Factor Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), que conduz a transcrição de várias citocinas e quimiocinas, principalmente interleucina-12 (IL-12), que recrutam e ativam as células T no local inflamatório, para a produção de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), responsável pela indução da explosão respiratória em macrófagos com produção de ERO via NADPH oxidase durante a fosforilação oxidativa mitocondrial, para a destruição das micobactérias (McLeish, 2013). Além disso, as células de Schwann também podem produzir ERO e sofrer agressão oxidativa e desmielinização (Bhat, 2012).

Em 1981, a OMS recomendou que pacientes com hanseníase fossem tratados com a PQT, constituída por DDS, rifampicina (RMP) e clofazimina (CFZ), como principal estratégia para interromper a cadeia de transmissão do *M. leprae* (WHO, 1982). No entanto, a PQT também pode gerar ERO e aumentar os danos oxidativo ao paciente, sendo a DDS o responsável pelo maior número de reações adversas, como a

formação de metemoglobina (MetHb) e anemia hemolítica (Swathi 2015). Estas reações estão principalmente relacionadas aos metabólitos hidroxilados da DDS, dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH) e Monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH) (Schiff *et al.* 2006). Além disso, alguns estudos relatam que a DDS e seus metabólitos podem alterar a homeostase do ferro e levar a disfunção mitocondrial, assim como estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a neurotoxicidade e neuroinflamação (Urrutia, 2014).

A elevada produção de ERO e NO por células de Schwann e macrófagos durante a PQT pode causar desequilíbrio redox e agravar as lesões à pacientes com hanseníase, além de efeitos nocivos em eritrócitos, como anemia hemolítica grave e MetHba (Vijayaraghavan, *et al.*, 2005). A MetHb sob influência redox do íon férrico ( $Fe^{3+}$ ) possui propriedades pró-oxidantes capazes de induzir mudanças estruturais e funcionais no endotélio vascular. Estas alterações levam a inibição do crescimento celular, alterações morfológicas e apoptose celular, eventos que conduzem a trombose vascular e desnudação endotelial (Balla *et al.*, 2007). No plasma humano, em condições fisiológicas, as moléculas de Fe normalmente não agridem o organismo, mas em sobrecarga de Fe, a Tf é saturada e o  $Fe^{3+}$  que não está ligado a Tf será reduzido a forma  $Fe^{2+}$  resultando no acúmulo de ferro livre não ligado a transferrina (NTBI), que pode se acumular no líquido cerebrospinal (LCE). O NTBI atua como catalisador das reações oxidativas e consequente síntese de radicais  $\cdot O_2$  e  $\cdot OH$ . Assim, DDS e seus metabólitos podem potencialmente causar danos no SNC (Ji e Kosman, 2015).

O ciclo redox reversível entre os estados de oxidação do ferro, íons ferroso e férrico, é essencial para a regulação e função do ferro no organismo. No entanto, o excesso de ferro pode ser prejudicial na geração de ERO, com isso é importante equilibrar os níveis deste metal, a fim de controlar os efeitos fisiologicamente benéficos do ferro e as graves consequências decorrentes da deficiência ou sobrecarga deste metal, incluindo no SNC. Além disso, a MetHb pode influenciar no transporte e acúmulo do ferro no tecido cerebral (Mohorovic *et al.*, 2014). Com isso, é importante investigar os efeitos da MetHb sobre regulação de ferro, visto que podem estar associados ao desenvolvimento da neuroinflamação, neurotoxicidade, neurodegeneração e alterações comportamentais, como depressão e ansiedade, observados em pacientes com hanseníase.

Deste modo, é necessário a realização de estudos que possam elucidar o papel da DDS no acúmulo de Fe nos níveis de MetHb e seus possíveis danos no SNC, assim como avaliar o desequilíbrio do estado redox e propor terapias antioxidantes com mecanismos neuroprotetores para reestabelecer os níveis de MetHb e o equilíbrio redox do organismo, uma vez que o azul de metileno pode ser bastante tóxico.

Nesse sentido, a hemoglobina pode ser a principal fonte de sobrecarga de ferro cerebral durante a ruptura da BHE, promovendo a geração de ERO, peroxidação de PUFA, distrofia axonal e neurodegeneração (Chiueh, 2001). Estudos mostram que a sobrecarga de ferro intracraniana desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão de algumas doenças do SNC, como doença de Alzheimer, Parkinson e hemorragia cerebral (Meng *et al.*, 2017).

Durante décadas, o acúmulo e a reatividade do ferro no córtex cerebral foram

relacionados à neurodegeneração e indução do estresse oxidativo cerebral em uma série de doenças neurodegenerativas (BUIJS, 2017). Assim, a deposição anormal de ferro pode ocasionar morte celular associado ao acúmulo de ERO e danos patológicos, predispondo indivíduos a alto risco de declínio cognitivo e motor (Li *et al.*, 2015).

Os processos inflamatórios desencadeiam uma série de eventos, incluindo aumento da produção de ERO e NO, desequilíbrio homeostático do metabolismo do ferro e disfunção mitocondrial. Além disso, a microglia ativada possui altos níveis de NO sintase (NOS) e NOX, dois sistemas enzimáticos que medeiam o aumento do grau oxidativo induzido na inflamação, levando à disfunção cognitiva e neurodegeneração (Zhang, 2015). Estes processos são fundamentais durante o estresse oxidativo e pode agravar lesões neuronais na sobrecarga do ferro no SNC. Assim, muitas evidências apoiam a ideia de que o ferro acumula-se progressivamente no cérebro, levando ao estresse oxidativo, morte celular e neurotoxicidade. Como consequência deste microambiente, a microglia pode ser ativada para combater uma lesão e pode contribuir para a neuroinflamação (Li, 2016).

Nesse contexto, substâncias antioxidantes, como o ácido  $\alpha$ -lipóico (ALA), podem atenuar o dano das ERO e reduzir a atividade inflamatória e, portanto, pode ter um efeito positivo na ferroptose neuronal e neuroproteção (Zhang 2018). Portanto, é de grande importância na clínica avaliar o potente efeito antioxidante do ALA sobre a formação da MetHb e alterações no SNC induzidas pela Dapsona em modelos *in vivo*. Uma das formas de avaliação é através de métodos laboratoriais que mostram o perfil oxidativo da hanseníase e do tratamento PQT. Dentre eles, temos: capacidade antioxidante total (TEAC), que será determinada através do método proposto por Miller *et al.* (1993) modificado por Re *et al.* (1999); substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), através do método de Khonn e Livesedge (1944) e adaptado por Percário *et al.* (1994) e; ferro sérico, pelo método colorimétrico de Goodwin modificado (Goodwin, et al, 1966). Nesse sentido, essas ferramentas laboratoriais podem contribuir para compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos no desequilíbrio redox, especialmente pelo ferro, causando alterações comportamentais. Além disso, pode possibilitar o planejamento de ações eficazes no controle e tratamento da hanseníase, com o uso de um antioxidante de baixo custo e toxicidade.

## OBJETIVOS

- Caracterizar o estresse oxidativo central e periférico na hanseníase.
- Caracterizar os aspectos fisiopatológicos da hanseníase relacionados ao estresse oxidativo.
- correlacionar as alterações oxidativas periféricas às alterações oxidativas no SNC e neuroinflamatórias na hanseníase
- Correlacionar o estresse oxidativo durante a PQT às alterações comportamentais observadas em pacientes com hanseníase.
- Caracterizar as consequências do tratamento com PQT.
- Análise laboratorial: realizar práticas para quantificar e avaliar os parâmetros bioquímicos da defesa antioxidante e do estresse oxidativo, como TEAC, TBARS e Ferro sérico.

CRONOGRAMA			
DIA	HORA	TURMA	ATIVIDADES
26/11	14-18	1	O estresse oxidativo induzido pela poliquimioterapia e alterações neurológicas na hanseníase
27/11	14-18	1	Métodos de avaliação laboratorial em Bioquímica oxidativa

RECURSOS
-Recursos metodológicos: Datashow, computador, quadro branco, espectrofotômetro, leitor de placa e reagentes para cada teste bioquímico.

PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aula teórica e prática expositiva e dialogada</li> <li>- Aula prática sobre métodos laboratoriais em bioquímica oxidativa</li> <li>- Aula teórica sobre o estresse oxidativo induzido pela poliquimioterapia e alterações neurológicas na hanseníase</li> <li>- Métodos Laboratoriais em Bioquímica oxidativa: TEAC, TBARS, Ferro sérico, para avaliação do estresse oxidativo.</li> </ul>

AVALIAÇÃO (Não obrigatória)

## ANEXO II

### FICHA DE INSCRIÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_

Matrícula: \_\_\_\_\_ Área de Concentração: \_\_\_\_\_

Orientador: \_\_\_\_\_

e-mail: \_\_\_\_\_

Telefone p/ contato: \_\_\_\_\_

Interesse/justificativa para inscrição no curso

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

DATA: \_\_\_\_\_ Assinatura do Aluno: \_\_\_\_\_

### ANEXO III

#### RELAÇÃO DE ALUNOS INSCRITOS

ALUNOS DE MESTRADO DO PNBC				
Nº	NOME	MATRÍCULA	CONCEITO (Não obrigatório)	FREQ.%
01				
02				
03				
04				
05				
06				
07				
08				

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALLA, J., VERCELLOTTI, G. M., JENEY, V., YACHIE, A., VARGA, Z., JACOB, H. S., BALLA, G. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 12, p. 2119-2138, 2007.
- BHAT, R.M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdiscip Perspect Infect Dis.**, v. 2012, Article ID 181089, 2012.
- BUIJS, M.; DOAN, N.T.; VAN ROODEN, S.; VERSLUIS, M.J.; VAN LEW, B.; MILLES, J, VAN DER GROND, J.; VAN BUCHEM, M.A. In vivo assessment of iron content of the cerebral cortex in healthy aging using 7-Tesla T2\*-weighted phase imaging. **Neurobiol Aging.**, v. 53, p. 20-26, 2017.
- CHIUEH, C.C. Iron overload, oxidative stress, and axonal dystrophy in brain disorders. **Pediatr Neurol.**, v. 25, n. 2, p. 138-147, 2001.
- GOODWIN, JF.; MURPHY, B; GUILLEMETTE, M. Direct measurement of serum iron and binding capacity. **Clinical chemistry**, v. 12, n. 2, p. 47-57, 1966.
- JI, C.; KOSMAN, D. J. Molecular mechanisms of non-transferrin-bound and transferrin-bound iron uptake in primary hippocampal neurons. **Journal of neurochemistry**, v. 133, n. 5, p. 668-683, 2015.
- KHONN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a New Aerobic Metabolite Whose Production by Brain Is Inhibited by Apomorphine, Methine, Ergotamine, Epinephrine and Menadione. **J Pharm Exp Therap.**, v. 83, n. 3, p. 292-300, 1944.
- LI, W., LANGKAMMER, C., CHOU, Y.H., MADDEN, D.J., ROPELE, S., LIU, C. Association between increased magnetic susceptibility of deep gray matter nuclei and decreased motor function in healthy adults. **Neuroimage**, v. 105, p. 45-52, 2015.
- LI, Y.; PAN, K.; CHEN, L.; NING, J.L.; LI, X.; YANG, T.; TAO, G. Deferoxamine regulates neuroinflammation and iron homeostasis in a mouse model of postoperative cognitive dysfunction. **J Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 268, 2016.
- McLEISH, K.R.; URIARTE, S.M.; TANDON, S.; CREED, T.M; LE, J.; WARD, R.A. Exocytosis of neutrophil granule subsets and activation of prolyl isomerase 1 are required for respiratory burst priming. **J Innate Immun.**, v. 5, n. 3, p. 277-289, 2013.
- MENG, F. X.; HOU, J.M.; SUN, T.S. Effect of oxidative stress induced by intracranial iron overload on central pain after spinal cord injury. **J Orthop Surg Res.**, v. 12, n. 1, p. 24, 2017.
- MOHOROVIC, L., LAVEZZI, A. M., PETROVIC, O. (2014). Methemoglobinemia—A biomarker and a link to ferric iron accumulation in Alzheimer’s disease. **Advances in Bioscience and BiotechnologVol**, v. 5, p. 12-18, 2014.

MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin Sci.**, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.

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

RE, R.; PELLEGRINI, R.; PROTEGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med.**, v. 26, n. 9, p.1231-1237, 1999.

SCHIFF, D.E.; ROBERTS, W.D.; SUE, Y.J. Methaemoglobinemia associated with dapsone therapy in a child with pneumonia and chronic immune thrombocytopenic purpura. **J Pediatr Hematol Oncol.**, v. 28, p. 395-398, 2006.

SCOLLARD, D.M. Infection with Mycobacterium lepromatosis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 95, n. 3, p. 500-501, 2016.

SWATHI, M; TAGORE, R. Study of oxidative stress in different forms of leprosy. **Ind J Dermatol.**, v. 60, n. 3, p. 321, 2015.

URRUTIA, P.J.; MENA, N.P.; NÚÑEZ, M.T. The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. **Front Pharmacol.**, v. 5, 2014.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIJAYARAGHAVAN, R.; SURIBABU, C.S.; SEKAR, B.; OOMMEN, P.K.; KAVITHALAKSHMI, S.N.; MADHUSUDHANAN, N.; PANNEERSELVAM, C. Protective role of vitamin E on the oxidative stress in Hansen's disease (Leprosy) patients. **Eur J Clin Nutr.**, v. 59, n. 10, p. 1121-1128, 2005.

WHO. World Health Organization. Study Group. Chemotherapy of leprosy for control programmes, 1982.

WHO. World Health Organization. **Weekly Epidemiological Record**, v 92, n 35, 501-520, 2017.

ZHANG, X.Y.; CAO, J.B.; ZHANG, L.M.; LI, Y.F.; MI, W.D. Deferoxamine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in mice. **J Neuroinflammation.**, v. 12, n. 1, p. 20, 2015.

ZHANG, Y.H.; WANG, D.W.; XU, S.F.; ZHANG, S.; FAN, Y.G.; YANG, Y.Y.; GUO, C.  $\alpha$ -Lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress, inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S Tau transgenic mice. **Red Biol.**, v. 14, p. 535-548, 2018.