

**Luiz Fernando Rimoli**

**Efetividade da Vitamina E na  
redução do Estresse Oxidativo, em  
Hansenianos da Forma Multibacilar  
sob Tratamento**

**São José do Rio Preto  
2006**

Luiz Fernando Rimoli

Efetividade da Vitamina E na redução do  
Estresse Oxidativo, em Hansenianos da  
Forma Multibacilar sob Tratamento

Tese apresentada à Faculdade  
de Medicina de São José do  
Rio Preto para obtenção do  
Título de Doutor no Curso de  
Pós-graduação em Ciências da  
Saúde, Eixo Temático:  
Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Moacir F. de Godoy

São José do Rio Preto  
2006

Rimoli, Luiz Fernando

Efetividade da vitamina E na redução do estresse oxidativo, em hansenianos da forma multibacilar sob tratamento. Luiz Fernando Rimoli. São José do Rio Preto – SP, 2006.

88 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Área de Concentração: Medicina

Orientador: Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy

1. Vitamina E; 2. Estresse oxidativo; 3. Ferritina;  
4. Hanseníase

# *Sumário*

<i>Dedicatórias e Agradecimentos</i> .....	i
<i>Lista de Abreviaturas e Siglas</i> .....	vi
<i>Resumo</i> .....	xi
<i>Abstract</i> .....	xiii
<i>Introdução</i> .....	1
<i>Revisão da Literatura</i> .....	12
<i>Casuística e Método</i> .....	36
<i>Resultados e Discussão</i> .....	46
<i>Conclusão</i> .....	60
<i>Referências Bibliográficas</i> .....	61
<i>Apêndice</i> .....	70

# *Dedicatória*

Aos meus pais João (in memoriam) e Eunice,  
ao meu irmão Lellis Antônio,  
a minha esposa Nely e a nossa filha Fernanda,  
pelos exemplos marcantes, incentivo,  
dedicação e alegrias, suportes do meu  
caminhar.

# *Agradecimento Especial*

Ao Prof. Dr. MOACIR FERNANDES DE GODOY, pilar mestre deste trabalho, pelos ensinamentos, confiança, apoio e presteza constante, cercados integralmente por marcante humildade.

“Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

# *Agradecimentos*

A Deus, pelas oportunidades que me oferece.

Aos Profs. Drs. Cléber Geraldo Gentil e Régis Alonso Verri, por terem me inserido na docência acadêmica.

Ao Prof. Dr. Casimiro Cabrera Peralta, pela amizade construída e fortificada ao longo dos anos, mestre e incentivador ímpar de minha formação universitária.

Ao Prof. Dr. Alex Tadeu Martins, amigo dileto, parceiro imprescindível nas lides das Disciplinas de Fisiologia da UNIFEB, a quem sobrecarreguei para a consecução deste trabalho, sempre me respondendo com transparente sorriso e imensurável disposição.

Ao Prof. Dr. Paulo César Naoum e equipe, pela valiosa contribuição, permitindo desenvolver esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, Diretor-adjunto do Programa de Pós-Graduação da FAMERP, pelo empreendedorismo e dinâmica contagiantes, promotores do desenvolvimento deste curso.

Ao Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann, Coordenador Geral do Programa de Pós-Graduação da FAMERP, pelos conhecimentos e dedicação, que imprimem qualidades a este curso.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Azoubel, Coordenador do Eixo Temático Medicina Interna, em respeito à dedicação e experiência, e pelos ensinamentos e gentilezas com que sempre me distinguiu.

Aos Profs. Valdecir Polizelli e Wanderley Polizelli, pela atenção e por terem se colocado à disposição, se necessário, em auxiliar este trabalho.

Ao Laboratório ATIVUS, pela cessão do medicamento “Zirvit E” utilizado na pesquisa.

À Enf<sup>a</sup>. Rita de Cássia Sandrini, ao Técnico de Enfermagem Pedro Montagnani e às Atendentes Terezinha Balarin de Oliveira e Luzia Sueli Curssi Pereira, pelo auxílio valioso na composição da casuística.

Aos profissionais do Laboratório de Análises Clínicas “Dr. João Spegiorin”, pela colaboração nas etapas de coleta e preparo do material.

Aos secretários do Curso de Pós-Graduação, Sra. Fabiana Cristina Godoy, Sr. José Antonio Silistino, Sra. Rosimeire Cleide S. Desidério, Sr. Guilherme Martins Dias e Sr. Carlos Rodrigo da Silva Viana, pelas atenções sempre a mim dispensadas.

A todos os professores que permitiram minha formação.

Aos pacientes, pela compreensão e espírito participativo, sem os quais não seria possível desenvolver este trabalho.

Aos meus familiares, amigos e a todos que contribuíram para que se tornasse realidade este meu sonho...

MUITO OBRIGADO.

# *Lista de Abreviaturas e Siglas*

ALT : alanina amino transferase

ASAP : prevenção de aterosclerose com suplementação de antioxidantes

AST : aspartato-amino-transferase

CAT : catalase

DNA : ácido desoxirribonucleico

DNIS : dinitrato de isosorbida

DO-1 : absorção de metahemoglobina existente no sangue

DO-2 : absorção de cianometahemoglobina

DO-3 : capacidade de transformação de oxihemoglobina para metahemoglobina

DO-4: capacidade de reversão da metahemoglobina para cianometahemoglobina

DVC : doença vascular coronária

ECG : eletrocardiograma

EDTA : ácido etileno diamino tetra acético

ERO : espécie reativa de oxigênio

ESR : ressonância de spin eletrônico

GSH : glutationa peroxidase  
GSSG : glutationa redutase  
HBO : oxigênio hiperbárico  
HD : hemodiálise  
HDL : lipoproteína de densidade alta  
HO · : radical hidroxil  
IL : interleucina  
IMC : índice de massa corporal  
LDL : lipoproteína de densidade baixa  
LP : peroxidação lipídica  
MB : multibacilar  
MDA : malondialdeído  
MFR : metahemoglobina ferricianida redutase  
MtHb : metahemoglobina  
n.s. : não significativo  
NADH : nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido  
NaNO<sub>2</sub> : nitrito de sódio  
oxLDL : lipoproteína de baixa densidade oxidada  
PCR : proteína C reativa  
PQT : poliquimioterapia  
RBC : células vermelhas sangüíneas  
RUV : radiação ultra-violeta  
SO<sub>2</sub> : dióxido sulfúrico  
SOD : superóxido dismutase

TBARs : substâncias ácido reativas tiobarbitúricas

TNF : fator de necrose tumoral

t-SH : thiol total

VC : vitamina C

VE : vitamina E

# *Lista de Siglas*

<	: menor
=	: igual
>	: maior
±	: mais ou menos
dl	: decilitro
μ	: micro
μg/dl	: micrograma por decilitro
μl	: microlitro
μM	: micromol
g	: grama
g/dl	: grama por decilitro
H <sub>2</sub> O	: água
K <sup>+</sup>	: potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: fosfato ácido de potássio
M	: mol
MeSO <sub>4</sub>	: sulfato de metila
mg	: miligrama
mg/dia	: miligrama por dia
mg/dl	: miligrama por decilitro

mg/K	: miligrama por quilo
mJ	: milijoule
ml	: mililitro
mm	: milímetro
mM	: milimol
Na <sup>+</sup>	: sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: fosfato ácido de sódio
NaCl	: cloreto de sódio
ng/ml	: nanograma por mililitro
nm	: nanômetro
O <sub>2</sub>	: oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: radical superóxido
ppm	: parte por milhão
U	: unidade
UI	: unidade internacional
β	: beta

# *Resumo*

A doença hanseníase, na sua forma multibacilar, é tratada com dapsona, clofazimina e rifampicina, e esta terapêutica provoca estresse oxidativo, levando ao aparecimento de metahemoglobinemia e formação de corpos de Heinz. Para combater o estresse oxidativo, tem-se utilizado a vitamina E, devido a sua função antioxidante. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da vitamina E em pacientes portadores de hanseníase, sob tratamento, na forma multibacilar, com a hipótese de trabalho de que pudesse haver redução do estresse oxidativo provocado pelo uso da medicação. O estudo envolveu 32 pacientes portadores de hanseníase da forma multibacilar, em tratamento com dapsona, clofazimina e rifampicina. Foi avaliada a presença prévia de estresse oxidativo por meio de uma coleta de sangue e posteriormente, os pacientes foram divididos em 2 grupos, aleatoriamente, com 16 pacientes em cada grupo, denominados: grupos “com vitamina E” e “controle”. Os pacientes do grupo “com vitamina E” fizeram uso de 800 UI/dia, por via oral, de vitamina E e o grupo “controle” não fez uso de suplemento vitamínico. Decorridos 30, 60 e 90

dias de tratamento suplementar, foram coletadas amostras de sangue dos 2 grupos para determinar a concentração de metahemoglobina, presença de corpos de Heinz e nível sérico de ferritina. Os resultados dos níveis séricos de ferritina foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney e os de metahemoglobina e corpos de Heinz foram submetidos ao teste exato de Fisher. Não foi encontrada diferença significativa entre os 2 grupos. Concluí-se que a vitamina E na dose e duração de tratamentos utilizados, não confere efeito protetor contra o estresse oxidativo causado pela dapsona, clofazimina e rifampicina utilizada pelos pacientes portadores de hanseníase da forma multibacilar, e também não altera os índices dos níveis séricos de ferritina.

# *Abstract*

The disease leprosy, in multibacilar form, is treated with dapson, clofazimine and rifampicin, and these therapeutics produce oxidative stress, causing methemoglobinemia and Heinz bodies. To prevent the oxidative stress, vitamin E has been used, due to its antioxidant action. Our objective was to evaluate the effectiveness of vitamin E in leprosy patients, under treatment, in the multibacilar form, with the hypothesis that could have a reduction of the oxidative stress produced by using medication. The study involved 32 leprosy patients of the multibacilar form, in treatment with dapson, clofazimine and rifampicin. The presence of oxidative stress was verified previously and later, the patients were divided into 2 groups, randomly, with 16 patients in each group, denominated: group "with vitamin E" and "control". The patients of the group "with vitamin E" used 800 UI/day, orally, of vitamin E and the group "control" did not make use of vitamin supplement. After 30, 60 and 90 days of supplemental treatment, samples of blood of the 2 groups

were collected to determine the methemoglobin concentration, presence of Heinz bodies and ferritin levels. The results of ferritin levels were submitted to the statistic test of Mann-Whitney, and the one of methemoglobin and Heinz body were submitted to the exact test of Fisher. There was no significant difference between the 2 groups. It is concluded that the vitamin E in the dose and treatment duration used, did not protect against the oxidative stress caused by dapson, clofazimine and rifampicin used by the leprosy patients in multibacilar form, and it did not reduce serum the ferritin levels.

# *Introdução*

O estresse oxidativo, decorrente da presença excessiva de radicais livres, pode ser causado por fatores genéticos, quando o sistema de defesa antioxidante não se encontra funcionando adequadamente e também por fatores ambientais, como por exemplo, o fumo, as radiações, o excesso de atividade física, as intoxicações metálicas, a ingestão de gorduras, frituras, carnes vermelhas, o consumo de álcool, o estresse físico e mental, etc.

Um radical livre é qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais elétrons livre na sua órbita externa. Esses elétrons livres ou não pareados têm uma instabilidade química muito grande, e sendo assim, são capazes de reagir com qualquer composto que esteja próximo, a fim de extrair desse composto o elétron necessário para sua estabilização, produzindo reações em cadeia e dano celular, sendo assim chamado de oxidante.

Os principais radicais livres estão relacionados ao oxigênio (substâncias oxigênio-reativo). O surgimento deste gás permitiu que fosse tornado muito mais eficiente o

processo respiratório bem como a atmosfera foi protegida contra as radiações letais.

Os efeitos maléficos do excesso de oxigênio são percebidos no meio ambiente sob forma de ferrugem, desgaste de estruturas, oxidação de alimentos, fermentação, etc.

Podemos entender a formação de radicais livres pelo nosso organismo em condições normais, pois são necessários no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células, a fim de gerar o ATP. Também os radicais livres, produzidos pelos macrófagos e neutrófilos, são importantes no combate às bactérias e fungos invasores do organismo e, sem eles, não haveria defesa adequada contra as infecções.

Existem dois sistemas naturais para redução de radicais livres que atuam eliminando-os ou então impedindo sua transformação em produtos mais tóxicos. Estes sistemas podem ser divididos em enzimáticos e em não enzimáticos <sup>(1)</sup>.

O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando estão em quantidade excessiva no organismo, ultrapassando a capacidade de neutralizá-los com os sistemas enzimáticos existentes. Esses sistemas enzimáticos de defesa são compostos pelas seguintes enzimas: Glutathione-Peroxidase, Catalase, Metionina-Redutase e Superóxido-Dismutase, os quais combatem, os seguintes radicais livres:

Peróxido de Hidrogênio, Superóxido, Oxigênio “singlet”, Hidroxila, Óxido Nitroso e Óxido Nítrico. Já os antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria, são exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos pela alimentação diária, ou como complementos nutricionais. Os principais podem ser divididos em: Vitaminas Lipossolúveis, Vitaminas Hidrossolúveis, os Oligoelementos e os Bioflavonóides <sup>(2)</sup> .

Normalmente, aproximadamente 95% do oxigênio advindo da respiração é neutralizado pela cadeia respiratória celular e termina seu ciclo metabólico, transformado-se em água, mas os 5% restantes são transformados em Radicais Livres, que se não forem adequadamente combatidos, ou se estiverem sendo formados em excesso, podem vir a ser prejudiciais para o organismo, causando uma situação anormal chamada Estresse Oxidativo <sup>(3)</sup> .

Medir ou quantificar os radicais livres é procedimento difícil, pelas próprias características dessas substâncias uma vez que, com meia vida de microssegundos, reagem geralmente com outros compostos quase instantaneamente após terem sido gerados <sup>(4)</sup> .

Diretamente podem ser medidos pela espectroscopia com ressonância de spin eletrônico (ESR), no qual cada radical livre, apresentando um espectro de ressonância específico, poderá ser identificado. Esse método

é limitado, não detectando radicais muito instáveis, que são os de maior interesse clínico, e tem custo elevado.

A quimioluminescência é outro método direto, baseado na energia liberada em forma de luz, quando um elétron passa de um nível energético mais baixo para um mais alto e depois retorna ao inicial. Pode ser medida espontaneamente ou induzida por luminol, substância que aumenta a produção de fótons em um luminômetro. Tem a seu favor a praticidade e o baixo custo, no entanto com pequena especificidade <sup>(4)</sup>.

A mensuração da peroxidação lipídica é importante, pela sua capacidade lesiva, afetando a dinâmica celular, sobretudo a troca iônica e de nutrientes através das membranas.

Os radicais livres reagem com ácido graxos insaturados produzindo várias substâncias, entre elas o dialdeído malônico, que é o produto final da peroxidação lipídica, dosado no plasma ou na urina por meio do ácido tiobarbitúrico.

Por espectrofotometria mensura-se a formação do grupo carbonil, oxidante das proteínas, advinda da reação de radicais livres com arginina, lisina, histidina e prolina <sup>(4)</sup>.

A ação deletéria dos radicais livres pode ser avaliada, de forma indireta entre os indicadores biológicos,

pelos glóbulos vermelhos. Representando aproximadamente 10% do conteúdo celular de um indivíduo, estes dispõem-se de modo a um contato abrangente com todo o organismo e são de fácil obtenção.

A hemoglobina, seu principal componente, na vigência de efeitos oxidantes sofre processo de degradação, gerando compostos, tais como, metahemoglobina e produtos de globinas precipitadas, os corpos de Heinz que indicam aumento na geração de radicais livres representados pelos íon superóxido, peróxido de hidrogênio, e íon hidroxila. Definitivamente, a reação celular vai se evidenciar por meio de ação redutora com elevação quantitativa dos níveis de superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase.

Havendo desequilíbrio entre enzimas redutoras e radicais livres, em favor do segundo, advirão os processos lesivos aos eritrócitos, pelos efeitos oxidativos impostos. A extensão do processo pode acometer até as células jovens, na medula óssea, expondo ao risco de alterações no DNA e conseqüentemente a mutações e neoplasias.

Ressalta-se que aproximadamente 3% da quantidade de hemoglobina é oxidada, de forma espontânea, à metahemoglobina, diariamente, mantendo-se níveis séricos abaixo de 1% por sua reconversão à hemoglobina dentro de processos metabólicos.

O tratamento da hanseníase, cujos pacientes apresentam-se na forma multibacilar (MB) constitui-se de uma dose mensal supervisionada, ou seja, na própria unidade de saúde e na presença do funcionário, de 600 mg de rifampicina e 300 mg de clofazimina e, diariamente, 50 mg de clofazimina e 100 mg de dapsona auto administrados. São 12 doses em até 18 meses <sup>(5)</sup>.

Já expostos à ação dos radicais livres pela alta capacidade infecciosa do *M. leprae*, vamos encontrá-los, também, expostos à ação da dapsona, que comumente leva ao aparecimento de metahemoglobinemia, com possibilidade de ocorrer a formação dos corpúsculos de Heinz. A diminuição da sobrevivência do eritrócito, decorrente do uso das sulfonas, atribui-se à sua atividade oxidante <sup>(6)</sup>.

Rimoli & Godoy <sup>(7,8)</sup> em 2000, verificaram que a doença hanseníase não provoca estresse oxidativo, e sim a terapêutica utilizada, ou seja, a dapsona, clofazimina e rifampicina, onde a ação danificante dos corpos de Heinz, sobretudo às proteínas das membranas das hemácias, provoca oxidação, servindo de estímulo para atuação imunológica dos macrófagos que, ao retirarem estes corpos, por fagocitose, produzem deformação na célula, resultando as “células mordidas”.

A ferritina é uma proteína que se localiza essencialmente no fígado. É a proteína da maior importância no armazenamento de ferro e está presente no plasma e em praticamente todos os tecidos corporais, especialmente naquelas células envolvidas na síntese de compostos férricos e no metabolismo e na reserva de ferro.

Os níveis séricos de referência são, para os homens, de 100 a 150 ng/ml e para mulheres, de 25 a 50 ng/ml. Os níveis de reserva tecidual de ferro podem ser um fator de risco para a doença arterial coronariana. Presume-se que o mecanismo pelo qual a ferritina seria aterogênica inclui a catálise da formação de radicais livres pelo ferro e subsequente peroxidação de lípidos <sup>(9)</sup>.

O radical superóxido ( $O_2^-$ ) é capaz de reduzir o ferro estocado na ferritina na forma de íon férrico para o estado ferroso, sendo então liberado. O íon ferroso livre catalisa a formação de radicais hidroxil ( $OH\cdot$ ) a partir do peróxido de hidrogênio via reação de Fenton. O radical livre assim formado inicia a peroxidação de lípidos <sup>(9)</sup>.

Quando ocorre um aumento de 1% na ferritina sérica, há um aumento de 4% no risco de infarto agudo do miocárdio. Homens com ferritina maiores ou iguais a 200 ng/ml teriam 2,2 mais risco de infarto do que aqueles com

níveis inferiores a 200 ng/ml. Indivíduos com níveis séricos de ferritina maiores do que 200 ng/ml e LDL-colesterol maiores que 193 mg/dl possuem risco relativo de infarto do miocárdio de 4,7 enquanto que para os pacientes apenas com níveis de ferritina maiores do que 200 ng/ml o risco relativo é da ordem de 1,8 <sup>(9,10)</sup>.

Os produtos da oxidação do colesterol (oxisteróis) iniciam e desenvolvem lesões ateroscleróticas e o excesso de ferro no corpo promove aterosclerose e doença coronária devido as suas propriedades pró-oxidativas <sup>(11)</sup>.

Um elo entre o estresse oxidativo e o metabolismo do ferro pode ser sugerido. O índice de ferro sérico e ferro saturado é diminuído com suplementação de antioxidantes (vitamina E, vitamina C e betacaroteno) em atletas em treinamentos <sup>(12)</sup>.

Para combater o estresse oxidativo tem-se utilizado o antioxidante lipídico-solúvel, a vitamina E, que foi descoberta na Universidade de Berkeley, Califórnia, em 1922, laboratorialmente, por Herbert M. Evans. A menor forma de vitamina E com atividade biológica foi isolada de planta original (trigo). Desde a sua descoberta, tem sido estudada, principalmente a função antioxidante e, recentemente, também a função da sinalização celular do tocoferol e tocotrienol. Tocoferol e tocotrienol são partes de uma cadeia

fixa de um ciclo de antioxidantes, que tem sido expressa como rede antioxidante <sup>(13)</sup>.

Dentre as oito isoformas de vitamina E, o alfa-tocoferol é o mais potente antioxidante solúvel em gordura conhecido na natureza. Por anos, pensou-se que ele somente funcionasse como varredor de radicais peroxil lipídicos, especificamente lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL), assim, servindo como um principal antioxidante na prevenção de aterosclerose. Nos últimos anos, muitas funções do alfa-tocoferol têm sido descobertas, incluindo não somente funções antioxidantes, mas também funções pró-oxidantes, de sinalização celular e regulatórias de genes. Décadas de estudos clínicos e pré-clínicos têm aumentado os conhecimentos a respeito da ação antioxidante da vitamina E e sua utilização em doenças crônicas e estresse oxidativo induzido. Os resultados destes estudos têm sido promissores, embora as revisões sejam variadas sobre a eficácia do alfa-tocoferol na prevenção e tratamento de doenças cardíacas, câncer e doença de Alzheimer. Acreditam que futuros estudos em descobrir os mecanismos celular e sistêmico podem ajudar guiar estratégias adequadas para tratamento clínico, usando a vitamina E em uma população diversa de indivíduos em fase de envelhecimento <sup>(14)</sup> .

Na proteção dos eritrócitos contra danos oxidativos causados pela dapsona tem-se utilizado vitamina E e vitamina C, pois a vitamina E profilática minimiza o potencial de hemólise no início da terapia com dapsona <sup>(15)</sup>.

Suplementação de vitamina E diminui a peroxidação lipídica em pacientes hemodializados e é considerada uma terapia acessória no combate ao estresse oxidativo <sup>(16)</sup>.

A vitamina E melhora a função das células beta em diabetes melito não insulino dependente, aumentando os níveis de insulina e de peptídeo C no plasma, pela indução da capacidade antioxidante do organismo e/ou redução da resistência à insulina nestes pacientes <sup>(17)</sup>.

Na primeira linha de defesa na peroxidação lipídica, a vitamina E é o antioxidante mais importante e confere proteção nos níveis de glutathione nos tecidos do fígado e coração quando avaliada sob estresse oxidativo em protocolos de exercícios de natação <sup>(18)</sup>.

Suplementação de vitamina E, vitamina C e selênio podem atenuar a elevação de proteína carbonil e malondialdeído quando se realizam exercícios pesados podem aumentar o estresse oxidativo <sup>(19)</sup>.

As vitaminas E e C, quando combinadas, duas vezes ao dia, reduzem a peroxidação lipídica e retardam o

progresso de aterosclerose carotídea ao longo dos anos <sup>(20)</sup>. Combinação dessas vitaminas diminui lentamente a progressão de hipercolesterolemia <sup>(21)</sup>.

Algumas drogas oxidantes, como dinitrato de isosorbida, precisam ser usadas cautelosamente, devido a peroxidação e metahemoglobinemia, e a vitamina E protege os tecidos contra o estresse oxidativo <sup>(22)</sup>.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi a avaliar a eficácia da vitamina E em pacientes portadores de hanseníase, sob tratamento, na forma multibacilar, com a hipótese de trabalho de que possa haver redução do estresse oxidativo provocado pelo uso da medicação.

# *Revisão da Literatura*

Após pesquisarem evidências de hemólise em 16 pacientes submetidos à terapia diária com 100 mg de dapsona, Kelly et al.<sup>(23)</sup>, em 1984, administraram 800 mg/dia, por 3 meses, de vitamina E (acetato de dl-alfa-tocoferol), mantendo-se a mesma dose de dapsona. Fatores de hemólise foram reexaminados imediatamente próximo ao término da terapia com vitamina E. Nenhuma mudança significativa foi demonstrada para os níveis de hemoglobina, contagem reticulocítica e haptoglobina, e no final da terapia com vitamina E, todavia, um aumento significativo nos níveis desta vitamina foi verificado no soro. A sobrevivência dos eritrócitos, mensurada em 4 pacientes antes e depois da terapia de vitamina E, também não mostrou mudança significativa. Contagem de corpos de Heinz nos eritrócitos, porém, diminuiu em 9 de 15 pacientes estudados, e nenhum mostrou aumento nesta mensuração enquanto recebia vitamina E. Concluíram que os pacientes que receberam 100 mg/dia de dapsona, associada à terapia de 800 mg/dia de

vitamina E, não melhoraram substancialmente o efeito hemolítico desta droga.

O nível da peroxidação lipídica nos eritrócitos humanos tratados com doxorubicina foi estudado e comparado com células pré-tratadas com alfa-tocoferol, por Geetha et al.<sup>(24)</sup> em 1989. Eritrócitos tratados com alfa-tocoferol tiveram reduzido os níveis de peroxidação lipídica com concomitante diminuição do dano na membrana. Este foi monitorado pelos níveis de absorção conjugada diene, hidroperóxido lipídico e peróxido lipídico. Alfa-tocoferol não foi efetivo na inibição da formação conjugada diene, mas os níveis de hidroperóxido lipídico e peróxido lipídico foram significativamente diminuídos. Níveis de metahemoglobina aumentaram nas células pré-tratadas com alfa-tocoferol. Lipídeos na membrana dos eritrócitos apresentaram-se diminuídos durante o tratamento com doxorubicina e o alfa-tocoferol reduziu significativamente o colapso dos lipídeos na membrana. Níveis de glutathione redutase foram mantidos nas células pré-tratadas com alfa-tocoferol. Os autores discorrem os resultados com base nas propriedades antioxidantes do alfa-tocoferol.

Poberezkina et al.<sup>(25)</sup> em 1992 estudaram a ação de diferentes doses de nitrito de sódio. Foi simulada em ratos, a hipóxia de nitrito ( $\text{NaNO}_2$ ) para mostrar como o nível de metahemoglobina (MtHb) no sangue depende da dose de  $\text{NaNO}_2$  administrada. Doses letais e subletais de  $\text{NaNO}_2$  (50% de MtHb e mais) promoveram diminuição na peroxidação lipídica (LP) nos microsossomos do fígado, enquanto o nível de hipóxia ativada foi médio ou leve. A introdução de  $\text{NaNO}_2$  tem ativação dose-dependente de superóxido dismutase (SOD) no fígado, sangue e tecidos do coração tão bem quanto os distúrbios nas estruturas de DNA. Dose considerada moderada de nitrito, ou seja, 40 mg  $\text{NaNO}_2$  /Kg de peso do rato diariamente durante 1 mês, promove hipóxia crônica levando às mesmas alterações metabólicas que a hipóxia aguda. A vitamina E normalizou LP, mas não o nível de metahemoglobina.

Ainda em 1992, Prussick et al.<sup>(15)</sup> verificaram se a administração oral de vitamina E e vitamina C poderiam proteger os eritrócitos dos danos oxidativos causados pela dapsona em pacientes com dermatite herpetiforme. Quinze pacientes portadores de dermatite herpetiforme inflamatória receberam terapia com dapsona e suplemento, 800 UI/d de vitamina E por 4 semanas; seguida de 1000 mg de vitamina C

por dia por 4 semanas, e, finalmente, combinando terapia de vitamina E e vitamina C por 4 semanas. Índice de hemólise foi estabelecido por linha de base depois do período de 4 semanas. A análise estatística dos resultados sugeriu que a administração oral de 800 unidades de vitamina E diariamente por 4 semanas confere efeito protetor contra a hemólise induzida por dapsona em pacientes com dermatite herpetiforme. Concluíram que a proteção parcial contra a hemólise, pela administração oral de vitamina E, se confirmou como clinicamente relevante para experiência futura, podendo permitir a continuidade de terapia oral de dapsona em pacientes que desenvolvem hemólise significativa. A vitamina E profilática para minimizar a hemólise potencial no início da terapia com dapsona, também pode ser adequada.

Salonen et al.<sup>(10)</sup>, em 1992 afirmaram que o ferro pode induzir peroxidação lipídica in vitro e in vivo em seres humanos, promovendo lesão isquêmica no miocárdio em animais experimentais. Testaram a hipótese de que alta concentração de ferritina sérica e dieta com alta quantidade de ferro estão associadas com um risco adicional de infarto agudo do miocárdio. Selecionaram homens (n=1.931), com idade de 42 a 60 anos, sem doença sintomática coronária

registrada, examinados no Estudo de Fatores de Risco da Doença Isquêmica do Coração em Kuopio na Finlândia Oriental entre 1984 e 1989. Cinqüenta e um destes homens, apresentaram infarto agudo do miocárdio durante o período de 3 anos. Com base na Hazard ratio, com ajuste para idade, ano de exame, anos e quantidade de cigarros, teste de exercício isquêmico em ECG, captação máxima de oxigênio, pressão sistólica sanguínea, glicose no sangue, cobre no soro, contagem de leucócitos sangüíneo, colesterol sérico de alta densidade, apolipoproteína B, e concentração de triglicérides, em homens com ferritina sérica  $\geq 200$   $\eta\text{g/l}$  tiveram 2,2 % (95% CI, 1,2-4,0 ;  $P < 0,01$ ) fator de risco – risco ajustado de infarto agudo do miocárdio comparado com homens com baixa concentração de ferritina sérica. Elevada concentração de ferritina sérica é um grande fator de risco para infarto agudo do miocárdio em todos modelos multivariados. Esta associação é forte nos homens com concentração de colesterol sérico de baixa densidade de 5,0 mmol/l (193 mg/dl) ou maior que os outros. Dieta enriquecida com ferro tem uma associação significativa com o risco de doença na Hazard ratio com as mesmas covariâncias. Concluíram que o alto nível de ferro acumulado como o estabelecido, pode elevar a concentração de ferritina sérica, que é um fator de risco para doença coronária cardíaca.

Em 1993, Zhen et al.<sup>(26)</sup> estudaram o efeito inibitório do alfa-tocoferol sobre a formação de metahemoglobina em ratos normais e ratos com ausência de catalase no sangue, pela exposição hemolítica ao óxido nítrico. A formação de metahemoglobina em ambos os ratos hemolisados expostos ao óxido nítrico foi significativamente inibida pela adição de alfa-tocoferol na concentração final de 1,2 a 5,8 mM. Correlações negativas foram observadas entre a concentração logarítmica do alfa-tocoferol e formação de metahemoglobina. A formação de metahemoglobina em ratos com ausência de catalase no sangue hemolítico foi maior que a dos ratos normais hemolisados com ou sem adição de alfa-tocoferol. A formação de metahemoglobina em ratos com ausência de catalase no sangue foi também significativamente inibida pela adição de mais de 500 unidades/ml de alfa-tocoferol, como também a formação de metahemoglobina nos ratos normais e ausentes de catalase no sangue foi inibida com dietilditiocarbamato de sódio na concentração final de 1M.

Segundo Coleman<sup>(27)</sup> (1993), a dapsona é útil no tratamento de grande número de condições inflamatórias que são caracterizadas por infiltrações neutrofílicas. É a droga de escolha para supressão de sintomas de dermatite

herpetiforme, que inibe o processo pelo qual os neutrófilos saem da circulação e migram para os tecidos lesados. Também previne normalmente a lesão tecidual causada pela destruição respiratória dos neutrófilos. Embora a dapsona possa causar sérias reações idiossincráticas, como agranulocitose, a tolerância da droga a altas doses é mais usualmente determinada pelos efeitos colaterais hematológicos da metahemoglobinemia e pela hemólise. Estes efeitos são consequência da N-hidroxilação hepática da dapsona formando metabólitos hidroxilamina, alguns deixando o fígado e entrando rapidamente nas células vermelhas. Tentativas têm sido feitas para neutralizar os efeitos hematotóxicos dos metabólitos pelo uso de antioxidantes como as vitaminas E e C. A co-administração de um inibidor metabólico, como a cimetidina, passa a ser utilizada numa tentativa de reduzir a metahemoglobinemia dapsona-dependente, ainda sem comprovação da eficácia.

Etlik et al.<sup>(28)</sup> em 1995, determinaram se a inalação de dióxido sulfúrico (SO<sub>2</sub>) a 10 ppm, 1 hora por dia, por 30 dias induz o estresse oxidativo e se a vitamina E (40 mg/Kg) junto com vitamina C (200 mg/Kg), administrada intraperitonealmente, uma vez a cada 3 dias, pode reduzir os danos na membrana das células vermelhas sangüneas de

porco guinéu. Concluíram que os níveis de malondialdeído (MDA), taxas de fragilidade osmótica, valores de metahemoglobina e sulfohemoglobina foram significativamente altos no grupo tratado com SO<sub>2</sub> quando comparados com o grupo controle (P<0,05) e os valores de fragilidade osmótica e MDA diminuíram notadamente no grupo tratado com SO<sub>2</sub> mais vitamina antioxidante (P<0,05).

É estabelecido que o acetoaminofem exhibe comportamento oxidativo. Pensando nisto, Tukul<sup>(29)</sup> (1995), estudou os efeitos do acetoaminofem (0,3 -14,5 µM) sobre os níveis de metahemoglobina, superóxido dismutase e atividade Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> + ATPase normal e pré-tratamento com vitamina E e C nos eritrócitos. Nos eritrócitos incubados com acetoaminofem, a concentração de metahemoglobina e a atividade da superóxido dismutase foram aumentadas, a atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> + ATPase foi diminuída pelo tratamento com acetaminofem. Vitamina E na dose de 1 mg/dl de eritrócitos em suspensão e vitamina C, na mesma dosagem promoveram proteção parcial da hemoglobina e superóxido dismutase contra a ação do acetoaminofem, sendo a primeira mais eficaz.

Lardo et al.<sup>(30)</sup>, em 1997, investigaram se a vitamina E teria um efeito protetor ao dano oxidante sobre as membranas de hemácias causado pela dapsona em pacientes com hanseníase. Estudaram 16 pacientes durante 4 meses, divididos em dois grupos. Grupo 1 (n=7), dose de dapsona: 100 mg/dia; Grupo 2 (n=9), dose de dapsona: 100 mg/dia associado com vitamina E (800 U/dia). Não incluiu pacientes com baixos níveis de Glicose-6-Fosfato Dehidrogenase devido a sensibilidade deles por esta droga. Todos os pacientes mostraram anemia normocítica e normocrônica, com diminuição nos níveis de haptoglobina (abaixo de 5 mg/dl). Análises mostraram que a contagem de reticulócitos não apresentou diferenças significantes entre os grupos. Para a metahemoglobina observaram no Grupo 1 um aumento entre o primeiro e o quarto mês, que não foi visto no grupo 2. Sugerem que a vitamina E, por via oral, confere efeito protetor parcial e não corrige os parâmetros de hemólise produzidos pelo tratamento com dapsona, exceto para os níveis de metahemoglobina que foram mais sensíveis aos danos oxidativos.

Os exercícios físicos aumentam a necessidade tecidual de oxigênio e respiração celular, e causa uma super produção de radicais livres. Quando a geração de radicais

livres excede a capacidade antioxidante das células acontece dano tecidual devido ao estresse oxidativo. Por esse motivo, parece importante aumentar a capacidade de removê-los dos tecidos. Treinamento controlado e dieta suplementar podem favorecer caminhos para esta limpeza tecidual. Neste estudo, Avellini et al.<sup>(31)</sup> em 1999, usaram cavalos de corrida de 3 anos que foram submetidos a uma prova de diferentes exercícios físicos antes e depois de 70 dias de treinamentos diários e dieta suplementar (vitamina E e selênio). Os tratamentos foram capazes de aumentar a resistência das células vermelhas sangüíneas ao estresse peroxidativo induzido in vitro e da atividade glutathiona peroxidase nos linfócitos. Além disso, eles também foram capazes de diminuir a concentração de malondialdeído no plasma também como o consumo de vitamina E e a mobilização dos antioxidantes de baixo peso molecular (aspecto exterior de radical peroxil total) seguido da prova de exercícios. Os resultados obtidos indicaram que o treinamento e a suplementação da dieta foram capazes de aumentar significativamente a defesa antioxidante dos cavalos, nos fluidos extracelular e células sangüíneas, deste modo, diminuindo o fenômeno peroxidativo decorrente do exercício físico.

Devido ao papel dos processos oxidativos em diabetes melito não-insulino dependente, Gokkusu et al.<sup>(17)</sup> (2001), investigaram o estado oxidante e antioxidante no plasma de pacientes com diabetes melito não-insulino dependentes e o efeito da suplementação com vitamina E (800 UI/dia) sobre o estresse oxidativo, sistema de defesa antioxidante, níveis de frutossamina e ação da insulina. Foram estudados 30 controles e 40 pacientes diabetes melito não insulino dependentes. Nos controles e pacientes, foram mensurados lipídeos plasmáticos, vitamina E, peróxido lipídico, thiol total (t-SH), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx), no estado basal e depois da suplementação com vitamina E por 1 mês. Todos lípides e frações lipídicas no plasma diminuíram significativamente, considerando que o nível de HDL foi alterado nos pacientes diabéticos suplementados com vitamina E quando comparados com valores padrões. Administração de vitamina E também reduziu significativamente a glicose em jejum e níveis de frutossamina, com aumento significante de peptídeo C no plasma e níveis de insulina ( $P < 0,01$ ,  $P > 0,001$ , respectivamente). Suplementação com vitamina E, níveis de TBARs foram significativamente menores ( $P < 0,001$ ) que os valores padrões para pacientes diabetes melito não-insulino dependentes. Por outro lado, atividades de GPx e SOD foram

significativamente maiores ( $P < 0,001$ ) que os valores padrões. Uma tentativa similar foi observada no conteúdo de thiol total, mas, neste caso, o aumento não foi significativo. Concluíram que a vitamina E melhorou a função das células beta, aumentando os níveis de insulina no plasma e os níveis de peptídeo C, possivelmente pela indução da capacidade antioxidante do organismo e/ou redução da resistência periférica em diabetes melito não-insulino dependente, e que estudos em longo prazo serão necessários para demonstrar os efeitos benéficos da vitamina E sobre o tratamento / prevenção de diabetes melito não-insulino dependente.

Bruunsgaard et al.<sup>(20)</sup>, em 2003, relataram que as vitaminas E e C são as mais importantes dietas antioxidantes, e além disso, a vitamina E tem efeito antiinflamatório. Suplementações com vitaminas E e C combinadas, duas vezes ao dia, por 3 anos reduziram a peroxidação lipídica e retardou o progresso comum de aterosclerose carotídea em homens saudáveis no estudo de Prevenção de Aterosclerose com Suplementação de Antioxidantes (ASAP). Investigaram o efeito de uma administração combinada de vitamina E e vitamina C sobre indicadores inflamatórios in vivo. Níveis circulantes do fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, interleucina (IL)-6, e proteína

C reativa (PCR) foram mensurados em homens de 45-69 anos no estudo ASAP com colesterol > 5,0 mmol/l antes e depois do tratamento placebo (n=52) ou suplementação combinada com 91 mg (136 UI) alfa-tocoferol e 250 mg de vitamina C, duas vezes ao dia (n=55) por 3 anos. O tratamento antioxidante por 36 meses não teve efeito nos níveis circulantes de TNF-alfa, IL-6 ou PCR. Concluíram que, por longo período, suplementação combinada com alfa-tocoferol e vitamina C em doses razoáveis não produz efeito antiinflamatório sistêmico na população de homens saudáveis com leve hipercolesterolemia e sem sinais de inflamação.

Toumainem et al.<sup>(11)</sup>, em 2003, afirmaram que produtos da oxidação do colesterol, oxisteróis, iniciam e desenvolvem lesões ateroscleróticas humanas e o excesso de ferro no corpo promove aterosclerose e doença coronária devido às suas propriedades pró-oxidativas. Estudaram as associações entre ferritina sérica e concentrações de oxisterol no plasma de 669 homens finlandeses orientais. Concentração sérica de ferritina teve correlação direta estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) com maior quantidade de oxisterol mensurada. Concluíram que o excesso de íon no corpo, como o estabelecido pela ferritina sérica, está

associado com o aumento dos níveis de oxisteróis circulantes, de origem enzimática e não enzimática no homem.

Aguilo et al.<sup>(12)</sup> em 2004, verificaram o efeito da suplementação de antioxidantes (vitaminas E e C, beta-caroteno) no estado do ferro basal em atletas antes e depois de seus treinamentos e temporada de competição (3 meses). Dezoito atletas masculinos treinados foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos; placebo (lactose) e suplementação com antioxidante (vitamina E - 500 mg/d; vitamina C- 1g/d; e beta-caroteno - 30 mg/d). O estudo foi simulado: parâmetros hematológicos, quantidade dietética, intensidade de atividade física, estado antioxidante (proporção GSH : GSSG), e estado do ferro basal (ferro sérico, transferrina, ferritina e índice na saturação de ferro) foram determinadas antes e depois da intervenção do experimento. Os exercícios diminuíram as defesas antioxidantes no grupo placebo mas não no grupo suplementado com antioxidante. Nenhuma mudança foi encontrada no número de eritrócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina, ou nos valores dos parâmetros do ferro sérico, depois de tomar coquetel antioxidante por 3 meses, completada a série de exercícios. O grupo placebo mostrou alto índice de estresse oxidativo, e diminuição de ferro sérico (24%) e índice de ferro saturado

(28%), que não pode ser atribuído aos aspectos da dieta usual dos atletas, nem à hemoconcentração. Concluíram que a prevenção com suplementação antioxidante diminuiu o índice de ferro sérico e ferro saturado, tendo sido sugerido um elo entre o metabolismo do ferro e estresse oxidativo.

Kraml et al.<sup>(32)</sup> (2004), compararam as concentrações de ferritina sérica e determinados marcadores de estresse oxidativo em pacientes com e sem doença vascular coronária estabelecida angiograficamente. Foram medidas em 216 pessoas com idade de 35-60 anos. O grupo paciente incluiu 76 pacientes com doença vascular coronária, estabelecida por coronariografia (DVC) (média de idade  $50,1 \pm 5,7$  anos) e 140 controles saudáveis (média de idade  $50,2 \pm 5,3$  anos). A concentração de ferritina no plasma foi maior nos pacientes ( $169,0 \pm 63,8 \mu\text{g/l}$ ) que o controle ( $87,7 \pm 41,3 \mu\text{g/l}$ ),  $P < 0,001$ . O grupo paciente mostrou concentrações maiores no plasma de anticorpos anti-oxLDL, nitrito/nitrato, tocoferol e colesterol de alta densidade lipoproteica (HDL-colesterol) que o controle; sobre os pacientes opostos, tiveram concentrações significativamente maiores de hemoglobina, trombócitos e triglicérides. Nas pessoas do grupo saudável foi investigada ferritina correlacionada possivelmente com retinol, índice de massa corporal (IMC), colesterol total,

triglicérides, colesterol de baixa densidade lipoproteica (LDL-colesterol), glicose sangüínea, creatinina, ácido úrico, alanina-amino-transferase (ALT), aspartato-amino-transferase (AST), hematócrito, eritrócitos, com ocorrência de doença vascular coronária e com sexo. Foi observada correlação inversa entre ferritina e HDL-colesterol. Concluíram que os altos níveis de ferro armazenados, mensurados pela concentração de ferritina sérica, podem contribuir para o estresse oxidativo e assim elevar o risco de desenvolver doença vascular coronária.

Radiação ultravioleta (RUV) gera espécies reativas de oxigênio na pele que podem exercer um papel deletério, mas informações sobre as propriedades fotoprotetoras de suplementos antioxidantes orais são conflitantes, segundo McArdle et al.<sup>(33)</sup>, em 2004. Foram examinados os efeitos de antioxidantes lipídicos solúveis, vitamina E e beta-caroteno, para reduzir marcas de estresse oxidativo e eritema em pele humana exposta a RUV. Dezesesseis pessoas saudáveis tomaram ou alfa-tocoferol (n=8; 400 UI/d) ou beta-caroteno (n=8; 15 mg/d) por 8 semanas. Biópsias, antes e depois da suplementação, foram realizadas de peles não exposta e exposta 6 hs após 120 mJ/cm<sup>2</sup> de RUV. Os efeitos dos suplementos sobre as marcas do estresse oxidativo na pele e

a dose mínima no eritema de RUV foram coletados. A vitamina E suplementar foi avaliada, tendo sua concentração no plasma aumentada de  $14,0 \pm 0,66$  para  $18,2 \pm 0,64$   $\mu\text{g/ml}$  ( $P < 0,01$ ), e na pele de  $0,55 \pm 0,09$  para  $1,6 \pm 0,19$   $\text{ng/mg}$  proteína ( $P < 0,01$ ). A suplementação de beta caroteno aumentou as concentrações plasmáticas de  $1 \pm 0,3$  para  $2,25 \pm 0,3$   $\mu\text{g/ml}$  ( $P < 0,05$ ), mas concentrações na pele não foram detectáveis. Depois da suplementação de vitamina E, RUV aumentou a concentração de malondialdeído na pele de  $0,42 \pm 0,07$  para  $1,24 \pm 0,16$   $\text{nmol/mg}$  proteína ( $P < 0,01$ ), enquanto glutathiona oxidada ou total aumentou de  $9,98 \pm 0,4$  % para  $12,0 \pm 1,0$  % ( $P < 0,05$ ). Suplementação de vitamina E diminuiu significativamente a concentração de malondialdeído na pele, mas nem vitamina E nem beta-caroteno influenciaram significativamente outra medida de oxidação na pele basal ou exposta a RUV. Concluíram que a suplementação de vitamina E ou beta-caroteno não produziu efeito na pele exposta à RUV. Embora suplementos de vitamina E tenham reduzido significativamente as concentrações de malondialdeído, nenhum suplemento afetou outra medida de estresse oxidativo na pele humana induzido pelo RUV, o que sugere efeito não fotoprotetor.

Dinitrato de isosorbida (DNIS) é o mais popular liberador de óxido nítrico, causando metahemoglobinemia como um importante efeito colateral. Inal et al.<sup>(22)</sup> em 2004, observaram o estado antioxidante e atividade metahemoglobina redutase depois de usar DNIS e DNIS mais vitamina E. Os ratos foram divididos em 3 grupos de acordo com o tratamento: grupo controle, grupo DNIS, grupo DNIS + vitamina E. Mensuraram a redução de glutathiona no sangue (GSH), malondialdeído no plasma (MDA), eritrócito superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e atividade metahemoglobina redutase NADH-dependente. No grupo DNIS, o nível plasmático MDA foi significamente alto comparado com o do controle ( $P < 0,005$ ). Mudanças na atividade SOD e GPx não foram significantes. Nos grupos DNIS e DNIS + vitamina E, catalase e atividade metahemoglobina redutase NADH-dependente foram significamente maiores que o grupo controle ( $P < 0,001$ ). Concluíram que as drogas oxidantes como DNIS precisam ser usadas cuidadosamente por causa da peroxidação e metahemoglobinemia. Esses achados sustentam a teoria que a vitamina E protege os tecidos contra o estresse oxidativo.

Vijayaraghavan et al.<sup>(34)</sup>, em 2005, realizaram uma pesquisa com pacientes portadores de hanseníase,

diagnosticados por meio de exame clínico e biópsia de pele, tendo também sido selecionados 25 pacientes saudáveis que compuseram o grupo I – controle; Grupo II (n=50) – pacientes em tratamento com poliquimioterapia (PQT) constituída por dapsona, clofazimina e rifampicina, como recomendados pela OMS, por um período de 12 meses. Este grupo foi subdividido em Grupo IIa (n=25) sem suplementação de vitamina E, e Grupo IIb (n=25) com suplementação de 400 UI/dia de vitamina E por 12 meses, junto com PQT. Índices de estresse oxidativo, estado antioxidante enzimático e não enzimático foram analisados nos Grupos: controle saudáveis, não tratados com vitamina E e aqueles suplementados com vitamina E. Tiveram como resultado, aumento na peroxidação lipídica (LP) nos grupos de hanseníase quando comparados com controle saudáveis (Grupo I x Grupo II) indicando que o estresse oxidativo é operacional nos indivíduos afetados. Os níveis de LP não diminuíram nos pacientes com PQT. Isto pode ser devido ao aumento da produção de radicais livres pela PQT que leva a morte intracelular do *M. leprae*. Tratamento com PQT tem um impacto limitado sobre o aumento do estresse oxidativo e diminuição do estado antioxidante. Co-administração de vitamina E com PQT diminuiu o estresse oxidativo e atividade do estado antioxidante. Concluíram que a administração oral de

vitamina E diminui o estresse oxidativo e aumenta o estado antioxidante em indivíduos afetados. Elevado estresse oxidativo é evidenciado pelo aumento de peroxidação lipídica (LP) e proteína carbonil nos casos de hanseníase, diminuindo o estado antioxidante.

Bader et al.<sup>(35)</sup> em 2006, investigaram o efeito da suplementação de vitaminas E e C por 4 semanas sobre o estresse oxidativo, induzido por oxigênio hiperbárico (HBO). Foram expostos em 3 protocolos seqüenciais, 19 homens saudáveis, ou seja, HBO (100% O<sub>2</sub>, 2,4 bar, 131 min.) antes (T1) e depois de 4 semanas de suplementação diária com 500 mg liberadas lentamente de vitamina C e 272 UI de vitamina E (T2). Um protocolo normoatmosférico (21% O<sub>2</sub>, 1,0 bar, 131 min) serviu como tratamento controle (não exposto). Amostras de sangue foram retiradas antes (B) e imediatamente após (A) o tratamento. Níveis plasmáticos de vitaminas A, C, E, betacaroteno, glutathione redutase e malondialdeído foram mensurados pelo HPLC. A capacidade antioxidante e peróxido lipídicos no plasma foram analisados por ELISA. Tiveram como resultados: HBO diminuiu a vitamina C e capacidade antioxidante (T1). Em T1, Delta A-B de vitamina C e peróxido lipídico foram diferentes dos não expostos. Suplementação com vitaminas aumentou os níveis plasmáticos de vitaminas

C e E para 28% e 37% respectivamente. Suplementação de vitamina diminuiu as concentrações de peróxidos lipídicos e glutathione redutase. Depois da suplementação, HBO diminuiu a vitamina C e glutathione redutase. Em T2, Delta A-B de vitamina C e peróxido lipídico foi significativamente diferente dos não expostos. Concluíram que em humanos, o estresse oxidativo diminuiu os níveis plasmáticos de vitamina C e a capacidade antioxidante e aumentou a peroxidação lipídica no plasma. Suplementação com vitaminas C e E não previniu estes efeitos.

Em 2006, Versari et al.<sup>(36)</sup>, avaliaram se porcos normais, fazendo uso de antioxidante por longo tempo, poderiam apresentar efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular. Porcos domésticos normais (V, n=6) foram avaliados por 12 semanas depois de dieta suplementada com vitamina E (100 UI/Kg/dia) e vitamina C (1g/dia) e comparados com controles normais (C, n=7). Foram avaliados perfusão do miocárdio e índice de permeabilidade por tomografia computadorizada após adenosina e dobutamina intravenosa. Foi avaliada in vitro a função endotelial e o tecido coronário estudado por imunofluorescência e coloração. Resposta na perfusão do miocárdio foi menor no V que no C depois da adenosina ( $10,1 \pm 4,5$  x  $53,4 \pm 5,2\%$ ;

$P < 0,01$ ) e dobutamina (V,  $78,4 \pm 8,1$  ; C,  $193,0 \pm 39,0\%$ ;  $P < 0,05$ ). O índice de permeabilidade diminuiu em V depois da adenosina ( $4,8 \pm 5,1\%$ ) e dobutamina ( $59,9 \pm 13,6\%$ ) e não teve mudança em C. Vasodilatação coronária por bradicinina foi menor em V do que em C. Além disso, em V, nitrotirosina coronariana e o conteúdo de superóxido foram significativamente maiores que em C. A expressão monomérica total na síntese endotelial de óxido nítrico, foi similar em todos os grupos, enquanto as formas divididas, refletindo união enzimática, foram menores em V. Com esses achados, os autores sugerem que antioxidante e por longo tempo, como suplementação de vitaminas em porcos normais, comprometem a perfusão miocárdica e função endotelial por aumento no nível do estresse oxidativo na parede endotelial, que pode ser parcialmente refletida pela desunião da síntese endotelial de óxido nítrico e/ou efeito pró-oxidante direto radical da vitamina.

Alzheimer é uma doença neurodegenerativa caracterizada pelas perdas da memória e de outras funções cognitivas. Segundo Landmark<sup>(37)</sup>, em 2006, o estresse oxidativo é um possível fator patogênico, e antioxidantes como vitaminas C e E podem, por consequência, apresentar um efeito benéfico e reduzir os danos causados pelo beta-

amilóide. Revendo a literatura encontrou vários estudos experimentais, incluindo também indivíduos saudáveis e idosos, indicando que as vitaminas C e E, principalmente dos alimentos, bem como as combinações de altas doses das mesmas vitaminas suplementadas, podem ter efeito benéfico nos pacientes portadores da doença de Alzheimer. Um experimento clínico controlado em pacientes com manifestações da doença, aos quais 2000 mg/dia de vitamina E foram dadas, teve uma confirmação destes resultados. Concluiu que uma relação causal entre a quantidade de vitaminas e demência de Alzheimer não está bem esclarecida, e as dosagens corretas não são conhecidas, mas dieta rica desta vitamina pode reduzir o risco da demência. São necessárias altas doses de vitamina E, associada a vitamina C.

Ainda em 2006, Yang et al.<sup>(38)</sup> verificaram se a infusão intravenosa de vitamina C (VC) e/ou uso de vitamina E (VE) na membrana dialítica poderia atenuar o estresse oxidativo. Foram recrutados 80 pacientes sob hemodiálise (HD), cronicamente, e aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: HD (n=20), HD com VC intravenosa (n=20), HD com VE revestida dializada (n=20) e HD com ambas (n=20). Avaliaram o estresse oxidativo no sangue e plasma, atividade

dos eritrócitos pela metahemoglobina/ferricianida redutase (células vermelhas sangüíneas (RBC)-MFR), metahemoglobina no plasma, e citocina pró-inflamatória nestes pacientes. Todos pacientes mostraram nítido aumento (14 vezes) de espécies oxigênio reativos no sangue (ERO) depois da HD. Os tipos de ERO foram principalmente de peróxido de hidrogênio. VC intravenosa atenuou significativamente o estresse oxidativo induzido em HD. A VE na membrana dialítica preveniu, efetivamente, as hemácias do estresse oxidativo, embora tenha mostrado um efeito parcial sobre a redução da atividade total de ERO no sangue total. Concluíram que VC intravenosa e VE na membrana dialítica, são efetivas na diminuição do estresse oxidativo induzido, indicado pela hemólise e peroxidação lipídica, e pela super expressão das citocinas pró-inflamatórias em pacientes em HD, mesmo efeito observado quando VE é administrada isoladamente na membrana dialítica.

# *Casuística e Método*

## **SELEÇÃO DOS PACIENTES**

Para a realização deste estudo, foram incluídos 32 (trinta e dois) pacientes portadores de hanseníase nas formas multibacilar (multi), diagnosticados por exame clínico e baciloscópico e eventualmente por biópsia de pele, e que estavam sendo submetidos a poliquimioterapia.

Dos 32 pacientes, 20 eram do sexo masculino e 12 do sexo feminino, com idade média de  $50,0 \pm 15,2$  anos (mediana = 48 anos).

Estes pacientes foram informados dos objetivos do estudo, recebendo explanação sobre a doença e o que seria pesquisado, em linguagem acessível, e, manifestaram formalmente suas concordâncias, como mostra o apêndice A-1. Também uma ficha foi preenchida com os dados pessoais do paciente e sua enfermidade (apêndice A-2).

Antes da execução deste trabalho, e a seleção dos pacientes, foi realizado um Projeto de Pesquisa (nº. 3176/2002), que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética, em 10/06/2002 – parecer nº. 088/2002.

## **COLETA DE SANGUE**

Foi estabelecido jejum de 10 horas a esses pacientes e a coleta do sangue foi feita por punção de veia periférica superficial de membro superior (agulha hipodérmica 25 x 7), de 10 ml, transferindo 5 ml a um tubo com anticoagulante (EDTA), e 5 ml a um tubo seco, sendo este levado à centrifugação para separação do soro.

## **CONDIÇÃO EXPERIMENTAL**

Os pacientes portadores de hanseníase da forma multibacilar estavam em tratamento com dapsona, clofazimina e rifampicina, e, recebendo uma dose mensal supervisionada, ou seja, na própria unidade de saúde e na presença do funcionário,

de 600 mg de rifampicina e 300mg de clofazimina e, diariamente, 50 mg de clofazimina e 100 mg de dapsona auto administrados.

Foram coletadas amostras de sangue destes pacientes para verificar a presença do estresse oxidativo, e então divididos em 2 grupos, por sorteio, com 16 pacientes em cada grupo, denominados: Grupo “com vitamina E” e Grupo “controle”.

Após esta detecção, os pacientes do Grupo “com vitamina E” começaram a fazer uso de 800 UI/dia, por via oral, de vitamina E (Zirvit E – Laboratório Ativus) e o Grupo “controle”, não fez uso de suplemento vitamínico.

Decorridos 30, 60 e 90 dias de tratamento suplementar com a vitamina E, foram coletadas amostras dos 2 grupos para determinar a concentração de metahemoglobina, presença de corpos de Heinz e nível sérico de ferritina, conforme as técnicas descritas por Naoum<sup>(2)</sup>, a seguir:

## **A. CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA**

### **EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA A DOSAGEM DE METAHEMOGLOBINA**

- Espectrofotômetro da marca BAUSCH & LOMB, modelo Espectronic 70.
- Tubos de vidro 17 x 100 mm
- Pipetas de 1 ml, 2 ml e 10 ml
- Micropipetas Pasteur, pontas descartáveis de 50 e 100  $\mu$ l

### **REAGENTES UTILIZADOS PARA A DOSAGEM DE METAHEMOGLOBINA**

1. Solução tampão fosfato M/15, pH 6,8 (solução estoque)  
Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> . 12 H<sub>2</sub>O .....9,0 g  
KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> .....5,7 g  
Água destilada q.s.p. ....100 ml
2. Solução tampão fosfato M/60, pH 6,8 (solução trabalho):

Diluir 250 ml da solução estoque para 1 litro de água destilada (q.s.p.).

3. Solução de ferricianeto de potássio a 5% (preparada no dia):

Diluir 50 mg de ferricianeto em 1 ml de água destilada.

4. Solução de cianeto de sódio (preparada no dia):

Diluir 50 mg de cianeto de sódio em 1 ml de água destilada.

5. Saponina a 1% .

### **ANÁLISE LABORATORIAL PARA A DOSAGEM DE METAHEMOGLOBINA**

1. Em um tubo contendo 200 µl de solução de hemoglobina (ou 100µl de sangue total + 100 µl de saponina a 1%), adicionou 5 ml de solução tampão fosfato M/60 pH 6,8.
2. Dividiu-se igualmente a solução preparada em dois tubos identificados por A e B.
3. Ao tubo A:

Fez-se a leitura óptica (D.O.) da solução em 630 nm e anotou-se o valor como DO-1. Essa leitura estimou a absorção de metahemoglobina existente no sangue.

Adicionou-se, a seguir, 50 µl de cianeto de sódio, misturou-se com leve agitação, e após 30 segundos leu-se a solução em 630 nm e anotou-se o valor de DO-2. Essa leitura estimou a absorção de cianometahemoglobina.

#### 4. Ao tubo B:

Adicionou-se 50 µl de ferricianeto de potássio a 5%, misturou-se com agitação leve e após 30 segundos foi feita a leitura em 630 nm, anotou-se o valor como DO-3. Essa leitura estimou a capacidade de transformação de oxihemoglobina para metahemoglobina.

Após a leitura, adicionou-se 50 µl de cianeto de sódio, misturou-se levemente a solução, e após 30 segundos fez-se a leitura em 630 nm, anotou-se o valor como DO-4. Essa leitura estimou a capacidade de reversão da metahemoglobina para cianometahemoglobina.

#### 5. Branco:

Todas as medidas foram realizadas contra o branco contendo 2,5 ml de solução tampão fosfato e 50 µl de saponina a 1% .

6. Cálculo:

$$\left[ \frac{(DO-1) - (DO-2)}{(DO-3) - (DO-4)} \right] \times 100 = \% \text{ metahemoglobina}$$

Interpretação: valores acima de 2,0% foram considerados aumentados.

## **B. PRESENÇA DE CORPOS DE HEINZ**

### **EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS CORPOS DE HEINZ**

- Microscópio binocular CARL ZEISS JENA (Variant JENAMED) com lente de imersão
- Tubos de vidro 12 x 75 mm
- Lâminas
- Banho-maria a 37°C da marca FANEM
- Pipetas Pasteur, ou micropipeta a 20 µl

**REAGENTES UTILIZADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS  
CORPOS DE HEINZ**

1. Solução cresil brilhante

Azul cresil brilhante .....	1,0 g
Citrato de sódio .....	0,4 g
Cloreto de sódio .....	0,8 g
Água destilada q.s.p. ....	100 ml

2. Solução violeta de metila (optativo)

Violeta de metila .....	0,5 g
NaCl 0,9% q.s.p. ....	100 ml

**ANÁLISE LABORATORIAL PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS  
CORPOS DE HEINZ**

1. Colocou-se 100 µl de sangue em um tubo e adicionou 100 µl de azul cresil brilhante.
2. Incubou-se o material contido no tubo a 37°C em banho maria, por 30 minutos.

3. Fez-se esfregaços finos, e examinou-se ao microscópico, em aumento de 100x com objetiva de imersão, identificando os corpos de Heinz.

### **CUIDADOS OBSERVADOS DURANTE A ANÁLISE LABORATORIAL**

1. Foi utilizado um controle normal.
2. Usou-se sangue fresco, com anticoagulante EDTA. O excesso de EDTA causa dificuldade na coloração.
3. Manter a temperatura do banho-maria em 37°C.

### **CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO**

Com a finalidade de avaliar a oxidação celular, a interpretação dos valores da dosagem de metahemoglobina foram considerados aumentados quando se apresentavam acima de 2,0 %, e para a quantificação dos corpos de Heinz foram considerados: ausente e menor ou igual a 1:500, normal; e, maior que 1:500 alterado.

### **C. NÍVEL SÉRICO DE FERRITINA**

O método utilizado para determinação dos níveis séricos de ferritina foi o teste ENZIMA IMUNOENSAIO, sendo os valores de normalidade de 3 a 212 ng/ml na mulher e 15 a 322 ng/ml no homem.

### **PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO**

Os valores encontrados na dosagem de metahemoglobina e quantificação de corpos de Heinz foram submetidos a análise estatística com auxílio dos testes exato de Fisher e Qui-quadrado, e para a comparação dos níveis séricos de ferritina entre os grupos, foi empregado o teste de Mann-Whitney. Admitiu-se erro alfa de 5%, sendo considerados significantes valores de P menores ou iguais a 0,05.

# Resultados e Discussão

De acordo com a metodologia utilizada, chegamos aos seguintes resultados:

## Resultados dos exames dos pacientes

### Pacientes em uso de Vitamina E

Quadro 1 – Concentração sérica de ferritina (ng/ml) encontrada nos pacientes portadores de hanseníase na forma multibacilar sob tratamento, com uso de vitamina E.

PACIENTE	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
F	302	104	87
M	36	192	18
F	52	67	94
M	259	195	236
F	190	93	132
F	103	28	39
F	91	61	89
M	100	313	122
M	304	316	234
F	98	91	36
M	43	405	268
M	85	101	92
M	253	193	271
F	36	37	26
F	23	14	13
M	94	124	182
Média	129,31	145,88	121,19
Desvio Padrão	98,48	114,72	90,53
Mediana	96,00	102,50	93,00

M- masculino; F- feminino

### Pacientes controle (sem uso de Vitamina E)

Quadro 2 – Concentração sérica de ferritina (ng/ml) encontrada nos pacientes portadores de hanseníase na forma multibacilar sob tratamento, sem uso de vitamina E.

PACIENTE	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
M	118	219	113
M	109	150	215
M	117	111	121
M	94	150	120
F	19	11	14
M	130	114	120
M	54	86	131
M	351	447	68
M	952	703	930
F	4	56	84
M	74	56	179
M	144	119	276
F	133	88	90
M	9	100	376
M	116	143	380
F	17	25	100
Média	152,5	161,1	207,3
Desvio padrão	228,5	175,8	219,2
Mediana	112,5	112,5	120,5

M- masculino; F- feminino

O grupo geral, os níveis séricos de ferritina foram estratificados, variando de 4 a 952 ng/ml, sendo a média de  $173,6 \pm 206,0$  ng/ml (mediana = 116,5 ng/ml), no grupo controle, e 13 a 405 ng/ml, sendo a média de  $132,1 \pm 100,0$  ng/ml (mediana = 96,0 ng/ml), no grupo que recebeu vitamina E.

O grupo controle foi composto por 12 homens e 4 mulheres, e como para cada paciente foram colhidas 3 amostras, totalizamos 36 amostras para os homens e 12

amostras para as mulheres. Nos homens, os níveis séricos de ferritina variaram de 9 a 952 ng/ml, com média de  $213,7 \pm 223,1$  ng/ml (mediana = 120,5 ng/ml). Nas mulheres, os níveis séricos de ferritina variaram de 4 a 133 ng/ml, com média de  $53,4 \pm 43,7$  ng/ml (mediana = 40,5 ng/ml).

O grupo que recebeu vitamina E foi composto por 8 homens e 8 mulheres e como para cada paciente foram colhidas 3 amostras, totalizamos 24 amostras para os homens e 24 amostras para as mulheres. Nos homens, os níveis séricos de ferritina variaram de 18 a 405 ng/ml, com média de  $184,8 \pm 103,1$  ng/ml (mediana = 192,5 ng/ml). Nas mulheres, os níveis séricos de ferritina variaram de 13 a 302 ng/ml, com média de  $80,1 \pm 66,2$  ng/ml (mediana = 77,0 ng/ml),  $P = 0,5096$ , (n.s.).

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Na amostragem da população geral, cuja mediana foi 116,5 ng/ml no grupo controle e 96,0 ng/ml no grupo com vitamina E, após a realização do teste de Mann-Whitney, verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos ( $P = 0,5096$ ), como mostra a Tabela 1, a seguir:

Tabela 1 - Teste de Mann-Whitney para comparação do nível sérico de ferritina na população geral.

Grupo	Tamanho da amostra	Mediana (ng/ml)	Mann-Whitney (U)	Valor de "z"	P
Controle	48	116,5	1242,5		
Com vitamina E	48	96,0	1061,5	0,6632	0,5096 (n.s.).

(n.s.) não significativo

Na amostragem da população masculina, a mediana dos níveis séricos de ferritina foi 120,5 ng/ml no grupo controle e 192,5 ng/ml no grupo com vitamina E. Após a realização do teste de Mann-Whitney, verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos ( $P=0,6238$ ), como mostra a Tabela 2, a seguir:

Tabela 2 - Teste de Mann-Whitney para comparação do nível sérico de ferritina nos pacientes do sexo masculino.

Grupo	Tamanho da amostra	Mediana (ng/ml)	Mann-Whitney (U)	Valor de "z"	P
Controle	36	120,5	399		
Com vitamina E	24	192,5	465	-0,4979	0,6238 (n.s.)

(n.s.) não significativo

Na amostragem da população feminina, a mediana dos níveis séricos de ferritina foi 40,5 ng/ml no grupo controle e 77,0 ng/ml no grupo com vitamina E. Após a realização do teste de Mann-Whitney, verificamos que não

houve diferença significativa entre os grupos ( $P=0,1310$ ), como mostra a Tabela 3, a seguir:

Tabela 3 - Teste de Mann-Whitney para comparação do nível sérico de ferritina nos pacientes do sexo feminino.

Grupo	Tamanho da amostra	Mediana (ng/ml)	Mann-Whitney (U)	Valor de "z"	P
Controle	12	40,5	189,5		
Com vitamina E	24	77,0	98,5	1,5269	0,1310

(n.s.) não significativo

Nossos achados não evidenciaram diferença significativa entre os grupos que receberam vitamina E e controle, diferentemente dos estudos de Aguilo et al.<sup>(12)</sup>, 2004, onde verificaram em experimento com atletas treinados, que o grupo que não fez uso da suplementação com antioxidante apresentou alto índice de estresse oxidativo, diminuição de ferro sérico e índice de ferro saturado, e nenhuma mudança foi encontrada no número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e parâmetros de ferro sérico no grupo que tomou coquetel antioxidante por 3 meses.

Como Aguilo et al.<sup>(12)</sup>, 2004; Makola et al.<sup>(39)</sup>, 2003, também verificaram que suplemento com micronutrientes, entre eles a vitamina E, resultou em aumento da

concentração de hemoglobina em 4,16 g/l e aumento na ferritina de 3 µg/l, reduzindo o risco de anemia e deficiência de ferro, e esses micronutrientes podem ser úteis e convenientes nas medidas preventivas e durante a gravidez.

Tem havido uma preocupação com os altos índices das concentrações da ferritina sérica, pois ela pode contribuir para o estresse oxidativo e assim elevar o risco de desenvolver doença vascular coronária <sup>(10),(11),(32)</sup>.

### **Resultados dos exames dos pacientes**

#### **Pacientes em uso de Vitamina E**

Quadro 3 – Concentração de metahemoglobina, em porcentagem, encontrada nos pacientes portadores de hanseníase na forma multibacilar sob tratamento, com uso de vitamina E.

PACIENTE	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
F	2,0	3,02	1,9
M	1,6	2,0	1,70
F	1,75	1,56	1,82
M	2,7	1,44	2,27
F	2,4	1,80	2,44
F	2,0	1,06	2,16
F	1,8	1,37	1,88
M	2,01	2,28	1,24
M	1,30	1,56	1,80
F	2,98	1,87	1,64
M	1,65	1,63	3,30
M	1,12	1,34	1,90
M	2,20	2,12	1,44
F	1,62	1,93	0,82
F	1,62	1,72	0,81
M	1,68	1,57	1,68

M- masculino; F- feminino

Quadro 4 – Quantificação de corpos de Heinz nos pacientes portadores de hanseníase na forma multibacilar sob tratamento, com uso de vitamina E.

PACIENTE	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
F	1:100	1:100	Ausente
M	Ausente	1:500	1:100
F	Ausente	Ausente	1:250
M	Ausente	Ausente	1:100
F	1:50	1:100	1:200
F	1:100	Ausente	1:50
F	1:50	1:50	1:600
M	1:30	Ausente	1:500
M	Ausente	1:50	Ausente
F	1:100	1:20	1:50
M	1:100	1:50	1:100
M	Ausente	Ausente	1:50
M	Ausente	Ausente	Ausente
F	Ausente	1:50	Ausente
F	Ausente	Ausente	Ausente
M	1:30	1:30	Ausente

M- masculino; F- feminino

#### **Pacientes controle (sem uso de Vitamina E)**

Quadro 5–Concentração de metahemoglobina, em porcentagem, encontrada nos pacientes portadores de hanseníase na forma multibacilar sob tratamento, sem uso de vitamina E.

PACIENTE	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
M	2,8	5,2	1,2
M	2,1	1,76	2,0
M	1,68	1,96	1,93
M	1,8	1,83	1,25
F	1,7	2,12	2,06
M	1,67	1,70	1,34
M	2,04	1,99	2,1
M	1,60	2,70	1,54
M	2,21	1,00	1,25
F	1,35	1,61	3,50
M	1,24	1,77	1,94
M	2,01	2,32	1,66
F	1,89	1,18	1,65
M	1,53	1,66	1,78
M	1,71	1,55	1,0
F	2,05	2,23	1,18

M- masculino; F- feminino

Quadro 6 – Quantificação de corpos de Heinz nos pacientes portadores de hanseníase na forma multibacilar sob tratamento, sem uso de vitamina E.

PACIENTE	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
M	1:100	1:100	1:50
M	1:50	1:50	1:50
M	1:200	Ausente	1:200
M	Ausente	1:100	Ausente
F	Ausente	1:100	Ausente
M	Ausente	1:50	1:300
M	1: 1:10	1:100	1:50
M	Ausente	1:50	1:100
M	1:50	Ausente	Ausente
F	1:50	1:20	Ausente
M	Ausente	1:50	1:50
M	Ausente	1:50	1:20
F	1:30	Ausente	1:200
M	1:200	1:200	1:100
M	1:500	1:200	Ausente
F	1:200	1:50	Ausente

M- masculino; F- feminino

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em relação ao estresse oxidativo, o grupo controle foi composto por 12 homens e 4 mulheres, e como para cada paciente foram colhidas 3 amostras, totalizamos 36 amostras para os homens e 12 amostras para as mulheres. Quanto aos homens, 27 amostras apresentaram estresse oxidativo e 9 sem estresse oxidativo. Em relação às mulheres, em 9 amostras foram detectadas estresse oxidativo e 3 sem estresse oxidativo. O grupo que fez uso de vitamina E, foi composto por 8 homens e 8 mulheres, e também foram

colhidas 3 amostras para cada paciente, totalizando 24 amostras para ambos. Quanto aos homens, 14 amostras apresentaram estresse oxidativo e 10 sem estresse oxidativo. Em relação às mulheres, 18 apresentaram estresse oxidativo e em 6 amostras não foram detectados os estresses oxidativo, como mostra o Quadro 7:

Quadro 7 – Distribuição das amostras da população em relação ao estresse oxidativo

Evento	HOMEM		MULHER	
	Controle	Com vitamina E	Controle	Com vitamina E
Com estresse	27	14	9	18
Sem estresse	9	10	3	6
Total	36	24	12	24

Foi aplicado o teste exato de Fisher para as populações masculina e feminina.

Na população masculina, não houve diferença estatisticamente significativa, pois o valor encontrado foi  $P = 0,141061$ , ou seja,  $P > 0,05$ .

Na população feminina, não houve diferença estatisticamente significativa, pois o valor encontrado foi  $P = 0,06646$ , ou seja,  $P > 0,05$ .

Quanto a população geral, foi realizado o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

Os grupos controle e o que fez uso de vitamina E foram compostos por 16 pacientes em cada, totalizando 48 amostras em cada grupo. No grupo controle, 36 apresentaram estresse oxidativo e 12, não. No grupo que tomou vitamina E, em 32 pacientes foi detectado estresse oxidativo e em 16, não.

Na população geral, não houve diferença estatisticamente significante, pois o valor de  $P = 0,50050$ , ou seja,  $P > 0,05$ .

Nossos resultados corroboram com os achados de Kelly et al.<sup>(23)</sup>, 1984 e Lardo et al.<sup>(30)</sup>, 1997 onde associaram vitamina E à dapsona e verificaram que esta combinação não melhora o efeito hemolítico da dapsona em humanos, diferente de Prussik et al.<sup>(15)</sup>, 1992, que afirmaram que o uso diário de 800 UI de vitamina E, confere efeito protetor contra a hemólise induzida pela dapsona em pacientes com dermatite herpetiforme, e Coleman<sup>(27)</sup>, 1993, que verificou a combinação das vitaminas E e C neutralizando os efeitos hematotóxicos da dapsona.

Contrariando também nossos achados, Vijayaraghavan et al.<sup>(34)</sup>, em 2005 sugeriram que a administração oral de 400 UI/dia de vitamina E por 12 meses

junto com a poliquimioterapia em pacientes com hanseníase, diminui o estresse oxidativo e aumenta o estado antioxidante em indivíduos afetados.

A formação de metahemoglobina em ratos normais e ratos com ausência de catalase no sangue hemolisados expostos ao óxido nítrico, foi inibida pela adição de alfa-tocoferol (Zhen et al.<sup>(26)</sup>, 1993), e uma dieta fortificada com vários antioxidantes em ratos, também reduziu a formação de metahemoglobina, promovendo proteção para as proteínas heme (Knudsen et al.<sup>(40)</sup>, 1996).

Os níveis de metahemoglobina aumentaram nas células pré-tratadas com alfa-tocoferol em estudo desenvolvido com hemácias humanas, in vitro (Geetha et al.<sup>(24)</sup>, 1989), enquanto Poberezkina et al.<sup>(25)</sup>, 1992, verificaram que esta vitamina não normalizou os níveis elevados de metahemoglobina após hipoxia induzida por nitrito de sódio em ratos, que vai ao encontro dos nossos estudos, onde a vitamina E também não alterou os níveis de metahemoglobina.

O colapso de lipídeos na membrana dos eritrócitos humanos é diminuído com o uso de alfa-tocoferol (Geetha et al.<sup>(24)</sup>, 1989) e promoveu maior proteção aos lipídeos nos tecidos renais de ratos quando houve um aumento na

diversidade e quantidade de antioxidantes (Knudsen et al.<sup>(40)</sup>, 1996).

Quando administrado suplemento de vitamina E como antioxidante, foi verificado que houve uma diminuição considerável na peroxidação lipídica (Geetha et al.<sup>(24)</sup>, 1989; Galli et al.<sup>(16)</sup>, 2001; John <sup>(41)</sup>, 2001; Gokkusu <sup>(17)</sup>, 2001; Barder et al.<sup>(35)</sup>, 2006) e esta diminuição também foi vista quando combinada com a vitamina C (Bruunsgaard et al.<sup>(20)</sup>, 2003) em estudo de Prevenção de Aterosclerose com Suplementação de Antioxidantes (ASAP). Para Senturk <sup>(42)</sup>, 2001, a vitamina E preveniu a peroxidação lipídica, e para Poberezkina et al.<sup>(25)</sup>, 1992, em estudo com ratos, normalizou; e os níveis de glutathione redutase foram mantidos quando tratados com alfa-tocoferol (Geetha et al.<sup>(24)</sup>, 1989).

Algumas doenças desenvolvem o estresse oxidativo e em outras, a formação de radicais livres é conseqüente às reações induzidas pelos tratamentos. Na doença neurodegenerativa Alzheimer, esta condição é um possível fator patogênico, e antioxidantes como vitaminas E e C podem apresentar um efeito benéfico e reduzir os danos causados pelo beta-amilóide (Landmark <sup>(37)</sup>, 2006), diferentemente da Hanseníase, onde a doença por si só, não

produz estresse oxidativo, e sim a terapêutica utilizada (Rimoli & Godoy<sup>(7,8)</sup>, 2000; Vijayaraghavan et al.<sup>(34)</sup>, 2005).

Neste experimento, a vitamina E na dose e duração do tratamento utilizada, não conferiu efeito protetor contra o dano oxidativo causado pela dapsona, clofazimina e rifampicina.

Usando selênio como antioxidante, Sarada et al.<sup>(43)</sup>, 2002, conseguiram um aumento nos níveis de glutathiona no plasma e tecidos e diminuição significativa nos níveis de malondialdeído, o que também foi verificado quando se utilizou como antioxidante, suplemento de vitamina E (Etlik et al.<sup>(28)</sup>, 1995 em ratos; McArdle et al.<sup>(33)</sup>, 2004 em humanos; Golgfarb et al.<sup>(19)</sup>, 2005) e quando combinada vitamina E e vitamina C (Etlik et al.<sup>(44)</sup>, 1997; Avellini <sup>(31)</sup>, 1999 em cavalos de corrida)

No presente estudo não se constatou efeito benéfico em relação ao estresse oxidativo utilizando 800 UI/dia de vitamina E por via oral durante 3 meses, e embora não tenha sido objetivo da pesquisa, os pacientes do grupo tratado com vitamina E, relataram melhora no estado geral, demandando inclusive, sobre a possibilidade da continuidade do uso do medicamento.

Pesquisas futuras poderão ser realizadas fazendo uma associação das vitaminas E e C, com doses e tempo de duração diferentes dessas utilizadas em nossos experimento, e também verificar, não somente a dosagem de metahemoglobina e quantificar corpos de Heinz, mas também os níveis de glutathione redutase, malondialdeído e peroxidação lipídica.

# *Conclusão*

A vitamina E na dose e duração do tratamento utilizada não confere efeito protetor contra o estresse oxidativo causado pela dapsona, clofazimina e rifampicina utilizada pelos pacientes portadores de hanseníase da forma multibacilar, nem reduz os níveis séricos de ferritina.

## *Referências Bibliográficas*

1. OLSZEWER, E. **Radicais livres em medicina**. São Paulo: Fundo Editorial Byk. 2ª Ed. 1997; p.17-9.
2. NAOUM, P.C.. Hemoglobinas instáveis. In: Naoum PC, editor. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Ed.Sarvier. 1997; cap 3, p.11-5.
3. GODOY, M.F., BRAILE, D.M.. Radicais Livres e seu papel em cardiologia – Atualização. **HB Científica**. 1996; v.3, n.1, p.31-56
4. LEMOS, A.H.. Métodos para avaliar radicais livres. In: **Radicais livres nas doenças cardiovasculares- Teoria e Prática**. Rio de Janeiro. 1998, p.23-7.
5. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Portaria nº 31, in: **Diário Oficial da União**. 2005, n.131, p.79, 11 julho.
6. DALPINO. D., MAGMA, L.A., OPRMOLLA, D.V.A. Atividade da NADH-redutase de metahemoglobina em hemolisado e membranas eritrocitárias de pacientes hansenianos sob tratamento sulfônico. **Hansen. Int.** 1998; v.23, n.1/2, p.14-26.

7. RIMOLI, L.F.. **Quantificação do estresse oxidativo no sangue de hansenianos sob efeito ou não de tratamento específico.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – SP, 2000, 95p.
8. RIMOLI, L.F., GODOY, M.F.. Quantificação do estresse oxidativo no sangue de hansenianos sob efeito ou não de tratamento específico. **Hansenologia Int.** 2001; v.26, n.2, p.93-8.
9. ANDRIOLO, A. Avaliação laboratorial dos fatores de risco da doença aterosclerótica. 2006; <http://www.fleury.com.br/htmls/mednews/mdcont/mdcont19.htm>.
10. SALONEN, J.T., NYSSONEN, K., KORPELA, H., TUOMILEHTO, J., SEPPANEN, R., SALONEN, R.. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. **Circulation.** 1992; v.86, n.3, p.803-11.
11. TUOMAINEN, T.P., DICZFALUSY, U., KAIKKONEN, J., NYSSONEN, K., SALONEN, J.T.. Serum ferritin concentration is associated with plasma levels of cholesterol oxidation products in man. **Free Radic Biol. Med.** 2003; v.35, n.8, p.922-8.

12. AGUILO, A., TAULER, P., FUENTESPINA, E., VILLA, G., CORDOVA, A., TUR, J.A., PONS, A.. Antioxidant diet supplementation influence blood iron status in endurance athletes. **Int. J. Sport Nutr Exerc. Metab.** 2004; v.14, n.2, p.147-60.
13. PACKER, L., WEBER, S.U., RIMBACK, G.. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. **J. Nutr.** 2001; v.13, n.2, p.369S-73S.
14. TUCKER, J.M., TOWNSEND, D.M.. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. **Biomed. Pharmacother.** 2005; v.59, n.7, p.380-7.
15. PRUSSICK, R., ALI, M.A., ROSENTHAL, D., GUYATT, G.. The protective effect of vitamin E on the hemolysis associated with dapsone treatment in patients with dermatitis herpetiformis. **Arch. Dermatol.** 1992; v.128, n.2, p.210-3.
16. GALLI, F., VARGA, Z., BALLA, J., FERRARO, B., CANESTRARI, F., FLORIDI, A., KAKUK, G., BUONCRISTIANI, U.. Vitamin E, lipid profile, and peroxidation in hemodialysis patients. **Kidney Int. Suppl.** 2001; v.78, p.S148-54.
17. GOKKUSU, C., PALANDUZ, S., ADEMOGLU, E., TAMER, S.. Oxidant systems in niddm patients: influence of vitamin E supplementation. **Endocr. Res.** 2001; v. 27, n.3, p.377-86.

18. METIN, G., ATUKEREN, P., GUMUSTAS, M.K., BELCE, A., KAYSERILIOGLU, A.. The effect of vitamin E treatment on oxidative stress generated in trained rats. **Tohoku J. Exp. Med.** 2002; v.198, n.1, p.47-53.
19. GOLDFARB, A.H., BLOOMER, R.J., MCKENZIE, M.J.. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 2005; v.37, n.2, p.234-9.
20. BRUUNSGAARD, H., POULSEN, H.E., PEDERSEN, B.K., NYSSONEN, K., KAIKKONEN, J., SALONEN, J.T.. Long term combined supplementations with alpha-tocopherol and vitamin C have no detectable anti-inflammatory effects in healthy men. **J. Nutr.** 2003; v.133, p.1170-3.
21. SALONEN, R.M., NYSSONEN, K., KAIKKONEN, J., PORKKALA-SARATAHO, E., VOUTILAINEN, S., RISSANEN, TH., TOUMAINEN, TP., et al.. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the antioxidant supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study. **Circulation.** 2003; v.107, n.7, p.947-53.
22. INAL, M.E., EGUZ, A.M..The effect of isosorbide dinitrate on methemoglobin reductase enzyme activity and antioxidant states. **Cell. Biochem Funct.** 2004; v.22, n.2, p.129-33.

23. KELLY, J.W., SCOTT, J., SANDLAND, M.M., VAN DER WEIDEN, M.B., MARKS, R.. Vitamin E and dapsone-induced hemolysis. **Arch. Dermatol.** 1984; v.120, n.12, p.1582-4.
24. GEETHA, A., SANKAR, R., DEVI, C.S.. Effect of alpha-tocopherol on peroxidative membrane damage caused by doxorubicin: an in vitro study in human erythrocytes. **Indian J. Exp. Biol.** 1989; v.27, n.3, p.274-8.
25. POBEREZKINA, N.B., ZADORINA, O.V., ANDRIUSHCHENKO, P.I., KHMELEVSKII, I.U.V.. The role of peroxidation process and antioxidant protection in nitrite-induced hypoxia and its correction with vitamins. **Ukr. Biokhim Zh.** 1992; v.64, n.6, p.64-70.
26. ZHEN, L.X., ISHII, K., TAKETA, K., OGATA, M.. Inhibitory effect of alpha-tocopherol on methemoglobin formation by nitric oxide in normal and acatalasemic mouse hemolysates. **Physiol.Chem. Phys. Med. NMR.** 1993; v.25, n.4, p.253-60.
27. COLEMAN, M.D. Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. **Br. J. Dermatol.** 1993; v.129, n.5, p.507-13.
28. ETLIK, O., TOMUR, A., KUTMAN, M.N., YORUKAN, S., DUMAN, O.. The effects of sulfur dioxide inhalation and antioxidant vitamins on red blood cell lipoperoxidation. **Environ Res.** 1995; v.71, n.1, p.25-8.

29. TUKEL, S.S.. Effects of acetaminophen on methemoglobin, superoxide dismutase and Na(+)-K+ ATPase activities of human erythrocytes. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 1995; v.35, n.4, p.719-24.
30. LARDO, M.M., DIAZ, N.B., ARTAZA, J.R., CARBIA, C.D., NAZER, R., VALDEZ, R.. Vitamin E as protective agent against hemolysis in leprosy patients under dapsone treatment. **Medicina.** 1997; v. 57, n.2, p.150-4, Buenos Aires.
31. AVELLINI, L., CHIARADIA, E., GAITI, A.. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). **Comp. Biochem Physiol B. Biochem Mol. Biol.** 1999; v.123, n.2, p.147-54.
32. KRAML, P., POTOCKOVÁ, J., KOPRIVOVÁ, H., STIPEK, S., CRKOVSKÁ, J., ZIMA, T., ANDEL, M.. Ferritin, oxidative stress and coronary atherosclerosis. **Vnitř. Lek.** 2004; v.50, n.3, p.181-3.
33. Mc ARDLE, F., RHODES, L.E., PARSLEW, R.A., CLOSE, G.L., JACK, C.I., FRIEDMANN, P.S., JACKSON, M.J.. Effects of vitamin E and beta-carotene supplementation on ultraviolet radiation-induced oxidative stress in human skin. **Am. J. Clin. Nutr.** 2004; v.80, n.5, p.1270-5.

34. VIJAYARAGHAVAN, R., SURIBABU, CS., SEKAR, B., OOMMEN, PK., KAVITHALAKSHMI, SN., MADHUSUDHANAN, N., PANNEERSELVAM, C.. Protective role of vitamin E on the oxidative stress in Hansen's disease (Leprosy) patients. **Eur. J. Clin. Nutr.** 2005; v.59, n.10, p.1121-8.
35. BADER, N., BOSY-WESTPHAL, A., KOCH, A., MUELLER, MJ.. Influence of vitamin C and E supplementation on oxidative stress induced by hyperbaric oxygen in healthy men. **Ann. Nutr. Metab.** 2006; v.50, n.3, p.173-6.
36. VERSARI, D., DAGHINI, E., RODRIGUEZ-PORCEL, M., SATTLER, K., GALILI, O., PILARCZYK, K., NAPOLI, C., et al.. Chronic antioxidant supplementation impairs coronary endothelial function and myocardial perfusion in normal pigs. **Hypertension.** 2006; v.47, n.3, p.475-81.
37. LANDMARK, K.. Could intake of vitamins C and E inhibit development of Alzheimer dementia? **Tidsskr. Nor. Laegeforen.** 2006; v.126, n.2, p.159-61.
38. YANG, CC., HSU, SP., WU, MS., HSU, SM., CHIEN, CT.. Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane on hemodialysis-induced oxidative stress. **Kidney Int.** 2006; v.69, n.4, p.706-14.

39. MAKOLA, D., ASH, D.M., TATALA, S.R., LATHAM, M.C., NDOSSI, G., MEHANSHO, H.. A micronutrient-fortified beverage iron deficiency, reduces anemia and improves the hemoglobin concentration of pregnant tanzanian women. **J. Nutr.** 2003; v.133, n.5, p.1339-46.
40. KNUDSEN, C.A., TAPPEL, A.L., NORTH, J.A.. Multiple antioxidants protect against heme protein lipid oxidation in kidney tissue. **Free radic. Biol. Med.** 1996; v.20, n.2, p.165-73.
41. JOHN, S., KALE, M., RATHORE, N., BHATNAGAR, D.. Protective effect of vitamin E in malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **J. Nutr. Biochem.** 2001; v.12, n.9, p.500-4.
42. SENTURK, U.K., GUNDUZ, F., KURU, O., AKTEKIN, M.R., KIPMEN, D., YALCIN, O., BOR-KUCUKATAY, M., YESILKAYA, A., BASKURT OK. Exercice-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercice-trained rats. **J. Appl. Physiol.** 2001; v.91, n.5, p.1999-2004.
43. SARADA, S.K., SAIRAM, M., DIPTI, P., ANJU, B., PAULINE, T., KAIN, A.K., SHARMA, S.K., BAGAWAT, S., ILAVAZHAGAN, G., KUMAR, D.. Role of selenium in reducing hypoxia-induced oxidative stress: an in vivo study. **Biomed. Pharmacother.** 2002; v.56, n.4, p.173-8.

44. ETLIK, O., TOMUR, A., TUNCER, M., RIDVANAGAOGLU, A.Y., ANDAC, O.. Protective effect of antioxidant vitamins on red blood cell lipoperoxidation induced by SO<sub>2</sub> inhalation. **J. Basic Clin. Pharmacol.** 1997; v.6, n.1-2, p.31-43.

# *Apêndice – A-1*

## **TERMO DE CONSENTIMENTO**

Declaro para os devidos fins que sei que tenho a doença hanseníase, também chamada “lepra”, e que precisa de tratamento com remédios.

Sei também que este tratamento pode provocar mudanças no meu sangue.

Fui informado que é possível não ter ou diminuir esta mudança tomando remédio “Vitamina E”, em comprimidos, pela boca.

Estou de acordo total em fazer parte do trabalho, deixando que tirem sangue meu para os exames, quando precisar.

Qualquer problema, sei que posso procurar o responsável por isto, Dr. Luiz Fernando Rimoli, que conheço e sei seu endereço e telefone.

Autorizo também mostrar os resultados dos exames em congressos e revistas.

### Consentimento pós-esclarecimento:

Declaro que, depois de tudo ter sido bem explicado pelo pesquisador, aceito participar desta pesquisa, por livre vontade, sem que tenha sido feito qualquer tipo de pressão.

Olímpia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (carimbo ou nome legível)

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura da testemunha

# Apêndice – A-2

LUIZ FERNANDO RIMOLI

## PESQUISA CIENTÍFICA

**HANSENÍASE / ESTRESSE OXIDATIVO / VITAMINA E**  
n°:

Paciente: \_\_\_\_\_ Reg.: \_\_\_\_\_ Olp. Sev. \_\_\_\_\_

End.: \_\_\_\_\_

D.Nasc.: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_

Início de tratamento : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

FORMA CLÍNICA: Paucibacilar ( I , T )  
Multibacilar ( V , D )

Medicação: -PQT Pb  
-PQT Mb  
-DNDS  
-Outros \_\_\_\_\_

Patologias associadas:

Diabetes \_\_\_\_\_ HA \_\_\_\_\_

Outras: \_\_\_\_\_

Hábitos:

Tabagismo \_\_\_\_\_ Etilismo \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

Antecedentes Mórbitos:

TB \_\_\_\_\_ Hepatite \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

EXAME/DATA	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___
FERRITINA				
METAHEMOGLOBINA				
CORPOS DE HEINZ				