

# Quantificação do estresse oxidativo no sangue de hansenianos sob efeito ou não de tratamento específico.\*

*Quantification of the oxidative stress in the blood of people with hansen's disease undertaking or not a specific treatment.*

Luiz Fernando Rimolli  
Moacir Fernandes de Godoy

## RESUMO

Neste estudo avaliamos a quantificação do estresse oxidativo no sangue de hansenianos sob efeito ou não de tratamento específico. Foram coletadas amostras de sangue de 62 portadores de hanseníase e 13 sadios. Destes 62 pacientes, 35 eram da forma multibacilar e faziam tratamento com clofazimina, dapsona e rifampicina; 16 da forma paucibacilar tratados com dapsona e rifampicina; 11 dos pacientes estavam sem tratamento, sendo 5 da forma multibacilar e 6 da forma paucibacilar. As amostras foram levadas para análises laboratoriais onde foram feitas as dosagens de metahemoglobina e contagem de corpos de Heinz. Os resultados encontrados foram submetidos à análise estatística com cálculo da Odds Ratio e Intervalo de Confiança 95%. Concluímos que a doença hanseníase não foi a causadora do estresse oxidativo, e sim a terapêutica administrada, e o grupo que fazia uso da clofazimina apresentou piores resultados, ou seja, maior estresse oxidativo.

**Descritores:** Hanseníase; estresse oxidativo; metahemoglobina; corpos de Heinz.

Extrato de Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Biologia Médica - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP - Fax (17) 227-6201 - CEP 15090-000

Mestre em Ciências da Saúde - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP - R. Benjamin Constant, nº 1520 -1c1. Álvaro Britto - Olímpia - SP - Cx. Postal: 73 - CEP 15400-000 - Telefone/Fax: (17) 281.3377 e-mail: rimoli@olimpianet.com.br

Chefe do Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP - Fax (17) 227-6201 - CEP 15090-000

## INTRODUÇÃO

A ação oxidante dos radicais livres pode ser avaliada indiretamente pelo efeito sobre os glóbulos vermelhos.

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

A hemoglobina, seu principal componente, na vigência de estresse oxidativo 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 Ion superóxido, peróxido de hidrogênio e ion hidroxila.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar, de forma indireta, pela dosagem de metahemoglobina e pesquisa da presença de corpos de Heinz, o estresse oxidativo em pacientes portadores de hanseníase, em ambas as formas, multibacilar (MB) e paucibacilar (PB), bem como o potencial efeito deletério do tratamento específico.

## CASUÍSTICA E MÉTODO

Para a realização deste estudo, foram incluídos 62 pacientes portadores de hanseníase nas formas MB e PB, diagnosticados por exame clínico e baciloscópico e eventualmente por biópsia de pele, e um grupo controle de 13 indivíduos sem a doença, perfazendo uma população total de 75 indivíduos. Destes, 37 eram do sexo masculino e 38 do sexo feminino. A faixa etária variou entre 16 a 80 anos. Trinta e cinco pacientes MB e 16 PB estavam sendo submetidos à poliquimioterapia e 11 pacientes diagnosticados ainda estavam sem tratamento, sendo 5 MB e 6 PB. Os pacientes MB em tratamento estavam recebendo clofazimina, dapsona e rifampicina enquanto dapsona e rifampicina eram

administradas aos PB.

A todos os participantes do estudo foi estabelecido jejum de 10 horas para a coleta de sangue, sendo que a mesma foi realizada por punção de veia periférica superficial de membro superior, e o sangue colhido foi transferido para um tubo com anticoagulante (EDTA), determinando posteriormente a concentração de metahemoglobina e presença de corpos de Heinz, especificados no Quadro 1.

**Quadro 1** — Condição Experimental: grupos e respectiva quantidade de pacientes nos quais foram realizadas a dosagem de metahemoglobina e quantificação de corpos de Heinz

GRUPOS	Ng DE PACIENTES
MB sob tratamento	35
PB sob tratamento	16
MB sem tratamento	5
PB sem tratamento	6
Controle	13

Os métodos utilizados para a dosagem de metahemoglobina e quantificação de corpos de Heinz foram os descritos abaixo:

#### A. CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA

##### Análise laboratorial para a dosagem de metahemoglobina

1. Em um tubo contendo 200 l de solução de hemoglobina (ou 100u1 de sangue total + 100 l de saponina a 1%), adicionou-se 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 nanômetros (nm) e anotou-se o valor como DO-1. Essa leitura estimou a absorção de metahemoglobina existente no sangue.  
Adicionou-se, a seguir, 50 l 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 l 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 l 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 permitiu estimar 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 l de saponina a 1%.

##### 6. Cálculo:

$(D0-1) - (D0-2) \times 100 = \% \text{ metahemoglobina}$   
 $(D0-3) - (D0-4)$

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

#### B. PRESENÇA DE CORPOS DE HEINZ

##### Análise laboratorial para a quantificação dos corpos de Heinz

1. Colocou-se 100 l de sangue em um tubo e adicionou-se 100 l de azul cresil brilhante.
2. Incubou-se o material contido no tubo a 37°C em Banho Maria, por 30 minutos.
3. Fez-se esfregagos finos, e examinou-se ao microscópico, em aumento de 100x com objetiva de imersão, identificando os corpos de Heinz.

#### CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO

Com a finalidade de avaliar a oxidação celular, os 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, doente.

#### PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Os valores encontrados foram submetidos a análise estatística com cálculo da odds ratio, com programa desenvolvido por Godoy & Braille (1999). A significância dos resultados foi verificada com auxílio do Intervalo de Confiança 95%.

#### RESULTADOS

A partir dos resultados obtidos foram realizadas as Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** — Quantidade de pacientes com valores maiores que 2,0% e menores ou iguais a 2,0% na dosagem de metahemoglobina.

Grupos	Ng Pacientes com valores < ou = 2,0 %	Ng Pacientes com valores >2,0%	Total de Pacientes
	MB sob tratamento	8	
PB sob tratamento	3	13	16
MB sem tratamento	5	0	5
PB sem tratamento	5	1	6
Controle	11	2	13

**Tabela 2** — Quantidade de pacientes que apresentaram corpos de Heinz nas seguintes proporções: ausente e menor ou igual a 1:500 ou maior que 1:500

Grupos	Ng Pacientes com corpos de Heinz ausente, < ou = 1:500	Ng Pacientes com corpos de Heinz :	Total de Pacientes
	MB sob tratamento	2	
PB sob tratamento	2	14	16
MB sem tratamento	5	0	5
PB sem tratamento	5	1	6
Controle	9	4	13

## 1. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS

### 1A - Análise comparativa da dosagem de metahemoglobina

Os resultados obtidos na Tabela 1 foram submetidos análise estatística odds ratio verificada pelo Intervalo de Confiança 95%, como mostra a Tabela 3. Verifica-se que tanto os pacientes MB como os PB sob tratamento tiveram significativamente mais comprometimento em termos de geração de metahemoglobina que os pacientes sem tratamento e controles, denotando efeito deletério primário da droga.

### 1 B . Análise comparativa da quantificação de corpos de Heinz

Os resultados obtidos na Tabela 2 foram submetidos A análise estatística odds ratio e Intervalo de Confiança 95%, como mostra a Tabela 4.

Pelos Intervalos de Confiança 95% obtidos a partir da odds ratio, podemos verificar que a diferença estatisticamente significante ocorreu entre os mesmos grupos

que também apresentaram diferença em termos de metahemoglobinemia.

## DISCUSSÃO

Os efeitos da clofazimina nas atividades dos neutrófilos, e os efeitos desta droga na transformação dos linfócitos para mitógenos, avaliados por Van Rensburg et al. (1982), em pacientes com hanseníase e indivíduos normais, estão de acordo com nossos resultados, onde os pacientes tratados com clofazimina apresentaram mais efeitos colaterais que o grupo controle, onde esta droga inibiu a transformação de linfócitos, e o efeito inibitório sobre a motilidade neutrófila estava associado com uma estimulação espontânea do metabolismo oxidativo.

Em relação à dapsona, Haas & Harrison (1989), afirmam que o principal efeito colateral desta droga é uma

**Tabela 3** - Comparação entre os grupos em relação à dosagem de metahemoglobina pelos cálculos Odds Ratio e Intervalo de Confiança 95%

GRUPOS	ODDS RATIO	IC 95%		Signifi- cância
		Min.	Max.	
MB sob tratamento X PB sob tratamento	0,78	0,18	3,43	n.s
MB sob tratamento x MB sem tratamento	33,75	1,66	686,28	
MB sob tratamento x PB sem tratamento	16,88	1,71	166,21	
MB sob tratamento x Controle	18,56	3,39	101,69	
PB sob tratamento x MB sem tratamento	43,33	1,83	1028,19	
PB sob tratamento x PB sem tratamento	21,67	1,80	260,59	
PB sob tratamento x Controle	23,83	3,35	169,39	
MB sem tratamento x PB sem tratamento	0,50	0,01	18,56	n.s
MB sem tratamento x Controle	0,55	0,02	14,43	n.s
PB sem tratamento x Controle	1,10	0,08	15,15	n.s.

n.s. - não há diferença significativa

\* - ha diferença significativa

**Tabela 4** - Comparação entre os grupos em relação a quantificação de corpos de Heinz pelos cálculos de Odds Ratio e Intervalo de Confiança 95%

GRUPOS	ODDS RATIO	IC 95%		Signifi- cância
		Min.	Mk.	
MB sob tratamento X PB sob tratamento	2,36	0,30	18,44	n.s
MB sob tratamento x MB sem tratamento	165,00	6,47	4207,29	*
MB sob tratamento x PB sem tratamento	82,50	6,26	1086,81	
MB sob tratamento x Controle	37,13	5,83	236,40	
PB sob tratamento x MB sem tratamento	70,00	2,68	1828,82	
PB sob tratamento x PB sem tratamento	35,00	2,58	475,33	
PB sob tratamento x Controle	15,75	2,37	104,54	
MB sem tratamento x PB sem tratamento	0,50	0,01	18,56	n.s.
MB sem tratamento x Controle	0,23	0,01	5,18	n.s
PB sem tratamento x Controle	0,45	0,04	5,21	n.s.

n.s. - não há diferença significativa

e - há diferença significativa

anemia hemolítica, sendo esta anemia caracterizada pela oxidação da hemoglobina em metahemoglobina, como em nosso experimento. Pacientes com hanseníase tratados com dapsona, habitualmente, apresentam hemólise mas também uma diminuição significativa na concentração de hemoglobina, segundo Byrd & Gelber (1991).

Corroborando com os nossos achados, Dalpino et al. (1998) concluíram que o nível de metemoglobina foi superior nos portadores de hanseníase em relação ao grupo controle, provavelmente devido à ação oxidante da sulfona, em pesquisa da atividade da NADH-redutase de metemoglobina em pacientes hansenianos sob tratamento sulfônico

A dapsona produz dano oxidante na membrana das hemácias em pacientes com hanseníase, como visto em nossa pesquisa, e [ardo et al. (1997), 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 os níveis de metahemoglobina que são sensíveis ao dano oxidante. Porém, Arutla et al. (1998), se opõem as afirmações citadas e dizem que a geração de ânions de superóxidos, pelo ofloxacina e pela dapsona têm propriedades antioxidantes, enquanto que a clofazimina e rifampicina comportam-se como pró-oxidantes.

Outro fator que nos levou a pensar que a medicação interferiu nos resultados, é que não é a doença hanseníase em si que leva à metahemoglobinemia, pois pacientes infectados pelo vírus HIV tratados com primaquina ou dapsona isoladas ou em combinação também apresentaram metahemoglobinemia clinicamente significativa, segundo Sin & Shafran (1996).

Em relação à NADH-redutase de metahemoglobina tanto quanto os níveis de hemoglobina e meta hemoglobina em pacientes portadores de hanseníase e indivíduos saudáveis, a proporção de indivíduos que mostraram uma deficiência parcial de NADH redutase de metahemoglobina foi significativamente maior nos pacientes de hanseníase que

entre os indivíduos saudáveis. Nossos resultados corroboram os encontrados Magma & Beiguelman (1984), onde a concentração de metahemoglobina entre pacientes com hanseníase foi significativamente maior quando comparada com indivíduos saudáveis, sendo que o nível de metahemoglobina entre pacientes de hanseníase foi influenciado pela quantidade de sulfonas no sangue.

Na quantificação de corpos de Heinz, nossos resultados concordam com os de Lachant & Tanaka (1987), que também verificaram que pacientes com características de hemoglobina E portadores de hanseníase desenvolveram corpos de Heinz e anemia hemolítica quando do uso diário de dapsona. As células vermelhas apresentaram aumento de corpos de Heinz, diminuição de glutatona reduzida, bem como sua estabilidade. Em pacientes que não faziam uso de dapsona, porém apresentando hemoglobina E, ocorreu aumento na formação de corpos de Heinz e o conteúdo de glutatona e sua estabilidade foram normais.

A anemia por si só pode ser responsável por aumento na formação de corpos de Heinz, mesmo na ausência de qualquer anormalidade nos eritrócitos, segundo Maier e Joss<sup>o</sup> (1978), sendo os agentes oxidantes excelentes para o diagnóstico de várias anormalidades do sangue.

Os corpos de Heinz, provocam oxidação sobretudo nas proteínas das membranas das hemácias, servindo de estímulo para atuação imunológica dos macrófagos que, ao retirarem estes corpos, por fagocitose, produzem deformação na célula, resultando nas "células mordidas" (NAOUM, 1997). Um exemplo desta ocorrência, verificado em um de nossos pacientes, encontra-se nas figuras 1 e 2.

Contrapõem-se aos nossos resultados, os descritos por Kelly et al. (1984), que encontraram uma diminuição na contagem de corpos de Heinz nos eritrócitos de pacientes submetidos diariamente à terapia com dapsona, porém administrando, juntamente com esta droga, vitamina E.

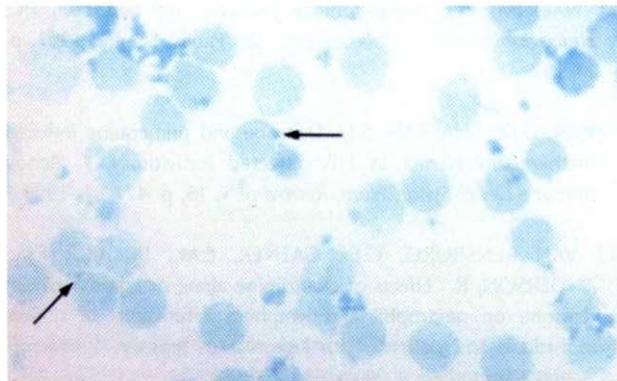


Figura 1. Eritrócitos com precipitados de corpos de Heinz em paciente portador de hanseníase (x 100 imersão).

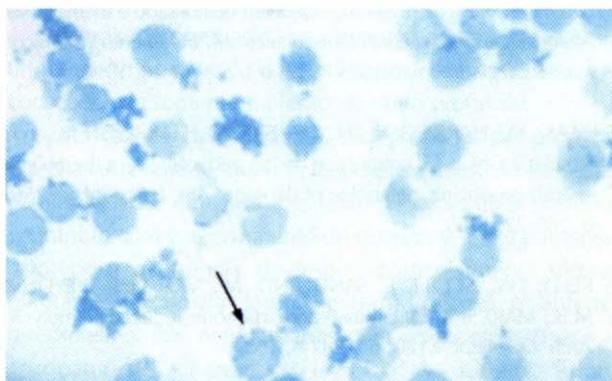


Figura 2. "Célula mordida" no sangue periférico de portador de hanseníase com hemoglobina instável (x100 imersão).

## CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento de pacientes portadores de hanseníase, em ambas as formas MB e PB, e não a doença em si, provocou o aparecimento de estresse oxidativo conforme determinações de metahemoglobinemia e presença de corpos de Heinz. A clofazimina, provavelmente, é responsável por um efeito oxidativo mais acentuado, uma vez que os pacientes com a forma multibacilar, os quais receberam esta droga, apresentaram níveis de detecção de corpos de Heinz superiores aos dos pacientes com a forma paucibacilar, não tratados com este medicamento.

## ABSTRACT

In this study we evaluated the quantification of the oxidative stress in the blood of people with Hansen's disease undertaking or not a specific treatment. It was collected blood

samples of 62 people carriers of Hansen and 13 healthy people. From these 62 patients, 35 were of multibacilar form and were being treated with clofazimine, dapsone and rifampicine; 16 of the paucibacilar form treated with dapsone and rifampicine; 11 of the patients were taking no treatment, being 5 of the multibacilar form and 6 of the paucibacilar form. The blood samples collected were taken for laboratory analyses where were made the dosage of methemoglobin and count of Heinz's bodies. The obtained results were submitted statistical analyses according to the Odds Ratio and Confidence Interval 95%. We concluded that the oxidative stress was caused by the therapy administered, not by the Hansen's disease itself, and the group that was taking clofazimine showed worse results, that is, higher oxidative stress.

**Uniterms:** Leprosy; oxidative stress; methemoglobin; Heinz's bodies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ARUTLA, S., ARRA, G.S., PRABHAKAR, C.M., KRISHNA, D.R. Pro and anti-oxidant effects of some antileprotic drugs in vitro and their influence on super oxide dismutase activity. *Arzneimittelforschung*. V. 48, p. 1024-7, 1998.
- 2 BYRD, S.R., GELBER, R.H. Effect of dapsone on haemoglobin concentration in patients with leprosy. *Leprosy Rev.* v. 62, p. 171- 8, 1991.
- 3 CALCULO DA ODDS RATIO E INTERVALO DE CONFIANÇA 95%. (<http://www.braile.com.br>) DPP Braille Biomédica, 1999.
- 4 DALPINO, D., MAGMA, L.A., OPROMOLLA, D.V.A. Atividade da NADH-redutase de metemoglobina em hemolisado e membranas eritrocitárias de pacientes hansenianos sob tratamento sulfônico. *Hansenologia Internationalis*, V. 23, n.1/2, p.14-26, 1998.
- 5 HMS, M., HARRISON, J.H., HAAS JR, M., HARRISON JR., J.H. Simulation of K-Cl cotransport in rat red cells by a hemolytic anemia producing metabolite of dapsone. *Am. J. Physiol* v. 256, p. 265-72, 1989.
- 6 KELLY, J.W., SCOTT, J., SANDLAND, M., VAN DER WEYDEN, M.B., MARKS, R. Vitamin E and dapsone induced hemolysis. *Arch. Dermatol* v.120, p. 1582-4, 1984.
- 7 LACHANT, N.A., TANAKA, K.R. Dapsone associated Heinz body hemolytic anemia in a Cambodian woman with hemoglobin E trait. *Am.J. Med. Sc!* v.294, p. 364-8, 1987.
- 8 LARDO, M. M., DIAZ, N.B., ARTAZA JR, CARBIA, C.D., NAZER, R., VALDEZ, R. Vitamin E as protective agent against hemolysis in leprosy patients under dapsone treatment. *Medicina (B. Aires)*. V. 57, p. 150-4, 1997.
- 9 MAGNA, L.A. , BEIGUELMAN, R. NADH-methemoglobin reductase and methemoglobinemia among leprosy patients. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* V. 52, p. 475-81, 1984.
- 10 MAIER, M., JOSSO, F. Influence of the hematocrit on formation of Heinz bodies within the red cells. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. V. 36, p. 359-61, 1978.
- 11 NAOUM, P.C. Hemoglobinas instáveis. In: NAOUM, P.C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997. p. 11-15.
- 12 SIN, D.D., SHAFRAN, S.D. Dapsone and primaquine induced methemoglobinemia in HIV infected individuals. *J. Acquir Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol* v. 15, p. 477-81, 1996.
- 13 VAN RENSBURG, C.E., GATNER, E.M., IMKAMP, EM., ANDERSON, R. Effects of clofazimine alone or combined with dapsone on neutrophil and lymphocyte functions in normal individuals and patients with lepromatous leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother.* . v. 21, p. 693-7, 1982.