

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE NOVAS FORMULAÇÕES CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Camila Silva SANTOS¹
Fabiane Veloso SOARES²
Antonia Maria Ramos FRANCO³

¹Bolsista IC INPA-PIBIC/CNPq; ²Colaboradora UFAM/INPA; ³Orientadora/INPA

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) constitui um problema de saúde pública em 98 países, distribuídos em cinco continentes (Alvar 2012). Segundo a Organização Mundial de saúde, de 1,5 a 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente, embora apenas 600 mil sejam oficialmente registrados (WHO 2011). Os antimoniais pentavalentes têm sido adotados há mais de meio século para tratamento de doenças parasitárias (Frézard e Demicheli 2009). Embora sejam fármacos de primeira linha e apresentem bons resultados clínicos no tratamento da leishmaniose cutânea, cada um dos diversos fármacos para o tratamento da leishmaniose apresenta eficácia limitada e desvantagens como: administração parenteral diárias, efeitos adversos, toxicidade, tratamento longo, necessidade de hospitalização e acompanhamento constante (Chakravarty e Jundar 2010).

Com objetivo de desenvolver drogas mais eficazes, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para o hospedeiro, novos alvos quimioterápicos da *Leishmania* têm sido investigados e novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos devem ser consideradas (De Paula *et al.* 2003). Estudos relatam sobre a possibilidade de construir macromoléculas nanométricas capazes de armazenar em seu interior a molécula de uma droga ou o princípio ativo de um medicamento, de modo que venham a funcionar como vetores capazes do transporte pelo organismo e do controle, seja da taxa de liberação, seja do ambiente fisiológico adequado, para que essa liberação do composto específico ocorra (Melo e Pimenta 2004).

Portanto, o objetivo desse estudo é avaliar a atividade biológica *in vivo* de formulações contendo medicamentos já utilizados para o tratamento de leishmanioses, através de duas vias de administração, utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*) como modelo animal, verificando a evolução morfológica das lesões causadas por *L. (L.) amazonensis*, bem como a viabilidade dos parasitas durante e após o tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O modelo biológico experimental *in vivo* para o estudo foram hamsters (*Mesocricetus auratus*) adultos (Comitê de Ética Animal CEUA/INPA sob o n° 009/2012) inoculados no focinho com 10⁶/mL de parasitas (MHOM/BR/09/IM 5584 – *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota recém isolada. O delineamento para a avaliação biológica foi determinado em experimentação, o qual continha três grupos recebendo tratamento (GExp) e um grupo controle negativo (GCN /sem tratamento) (Figura 1).

Foram utilizadas formulações em sigilo por estarem em processo de patente (Brazilian Patent BR 10 2013 029618 0). Também foi utilizado o Antimoniato de Meglumina (Glucantime®, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil), onde cada ampola de 5 mL contém 405 mg de antimônio pentavalente, correspondendo a 81 mg/mL.

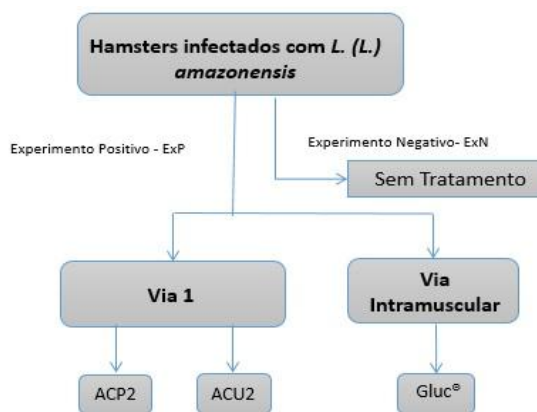


Figura 1. Delineamento Experimental. Sb: substâncias utilizadas em sigilo científico e Gluc = Glucantime®.

As formulações foram aplicadas na lesão uma vez ao dia/animal por 11 dias consecutivos, após esse período os animais apenas foram observados por mais 19 dias. Abaixo protocolo de tratamento:

Formulação	Volume	Via de administração
ACU 2	50mg	Via 1
ACP 2	50mg	Via 1
Glucantime®	20mg/kg/dia (0,15mL)	Intramuscular (IM)

A área total das lesões foi aferida, registrada diariamente com auxílio de paquímetro e fotodocumentada. Após tratamento, foi realizada a eutanásia (de acordo com as normas de uso animal) de cada um dos animais e fragmentos das lesões e outros órgãos (fígado, baço e rim) semeados em meio de cultura NNN, bem como preparação de impressão em lâminas coradas com Panótico (Panótico Rápido - Laborclin®).

Os dados apresentam distribuição normal ($p < 0,05$) segundo análise de variância paramétrica (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Os gráficos foram plotados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O arsenal terapêutico contra leishmaniose ainda é muito restrito (Machado-Pinto *et al.* 2002). Os antimoniais pentavalentes permanecem como as drogas de escolha para o tratamento da doença há mais de 50 anos (Lima *et al.* 2007), daí a importância de encontrar novas drogas eficazes para o tratamento da doença.

Ao analisar a figura 2, observamos que não houve redução significativa no tamanho das lesões cutâneas com as formulações ACPU, ACP em comparação aos grupos controles. Filho *et al.* (2008) ao estudarem a eficácia da Miltefosina por via oral e N-metil glucamina por via IM, concluíram que não houve diferença estatística significativa no tamanho das lesões.

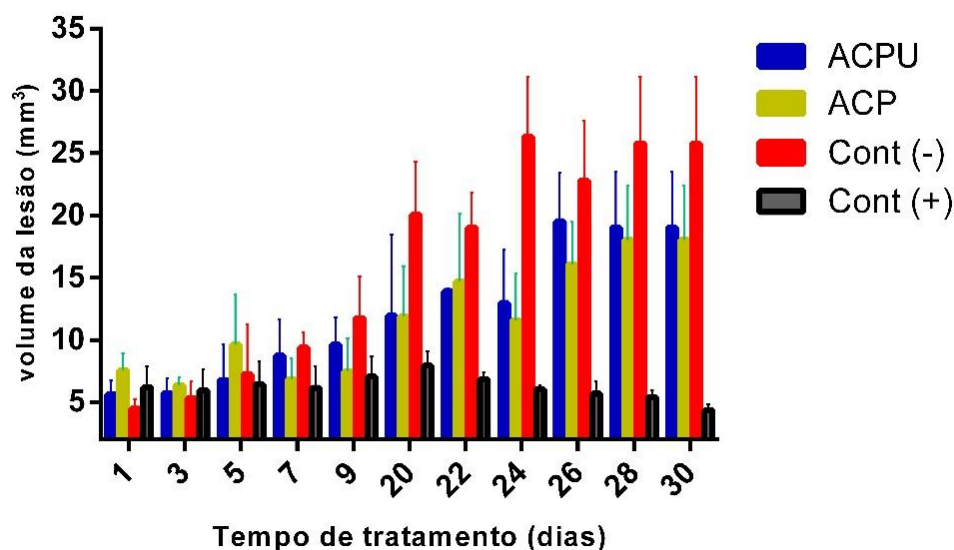


Figura 2. Evolução do tamanho das lesões cutâneas de hamsters infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, tratados durante 11 dias por vias 1, Via intramuscular e grupo sem tratamento (GCN) e somente observados por 19 dias.

Estudo nos sugerem que a via de administração do medicamento e o prolongamento da terapêutica, pode apresentar melhora da eficácia do tratamento, como descreveu Yépez *et al.* (1999), que hamsters tratados durante 20 dias com Glucantime® por via intramuscular mostraram uma diminuição da lesão e que com Glucantime® por via local, a redução das lesões foram notavelmente inibidas.

Além disso, a nova abordagem terapêutica com o uso do dispositivo de tatuagem para melhor direcionar a entrega da droga, que tem sido utilizada no tratamento experimental da doença, demonstrou eficácia *in vivo* em 10 dias de tratamento, com regressão completa das lesões cutâneas por volta do 28º dia (Shio *et al.* 2014).

Os resultados de culturas e impressão em lâminas quando comparados entre si demonstram o mesmo padrão de resposta para todos os grupos. Por exemplo, o fragmento de pele (lesão) apresentou parasitismo persistente em cultura, sendo confirmado com a presença de amastigotas em lâmina corada, ou seja, em termos de resultados positivos e negativos observou-se que o diagnóstico através das impressões em lâmina foi tão sensível quanto à cultura.

CONCLUSÃO

As terapêuticas disponíveis para o tratamento da leishmaniose humana são ainda substancialmente limitadas. Diante dos resultados observados, pode-se constatar de forma geral que há eficácia nas formulações testadas no tratamento de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*, apesar de não apresentarem redução significativa no volume das lesões, após o período tratamento, ainda que essas apresentem parasitas viáveis após tratamento.

Brevemente será realizada análise histológica e microscopia eletrônica de transmissão dos fragmentos de tecidos reservados. São necessárias novas pesquisas experimentais visando verificar a ação em outras espécies de leishmanias e tempo mais prolongado de tratamento.

REFERÊNCIAS

- Alvar, J.; Velez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Den Boer, M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS*, 7: 35671.
- Chakravarty, F.; Jundar S. 2010. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*.
- De Paula, C.D.R.; Sampaio, J.H.D.; Cardoso, D.R.; Sampaio, R.N.R. 2003. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, May/June, 36: 3.
- Filho, A.V.C. et al. 2008. Estudo comparativo entre Mitelfosine oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento de leishmaniose experimental causada por *L. amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(4): 424-427.
- Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R.R. 2009. Pentavalent Antimonials: *New Perspectives For Old Drugs*. *Molecules*, 30(14): 2317-2336.
- Lima, E.B.; Porto, C.; Motta, J.C.O.; Sampaio, R.N.R. 2007. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 82: 111-124.
- Melo, C.P.; Pimenta, M. 2004. Nanociências e Nanotecnologia. *Parcerias Estratégicas/CGEE*, 18: 09-21.
- Shio, M. et al. 2013 A Drug Delivery by Tattooing to Treat Cutaneous Leishmaniasis. *Nature*.
- Yardley, V. et al. 2006. American tegumentar leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *The Journal of Infectious Diseases*.
- Yépez, J. et al. 1999. Effect of intralesional treatment with Lidocaine and GlucantimeR in hamsters infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, XXXIX(1 Enero-Junio).
- WHO/OMS - World Health Organization/ Programmes and projects/ Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Acessado em 02/10/2014.