

# ESTUDO *IN VIVO* DE FORMULAÇÕES CONTENDO PRINCÍPIOS ATIVOS DE *Libidibia ferrea* APLICADAS AO TRATAMENTO TÓPICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Bruno Bezerra JENSEN<sup>1</sup>  
Claudia Comandoli WYREPKOWSKI<sup>3</sup>  
Antonia Maria Ramos FRANCO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup> Orientadora INPA; <sup>3</sup> Colaboradora UFAM / INPA

## INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, sua transmissão ocorre de forma vetorial por fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Neves *et al.* 2005). A doença pode apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Gontijo *et al.* 2003).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 98 países, distribuídos nos cinco continentes (África, América, Ásia, Europa e Oceania), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos (Brasil 2010; Alvar 2012). Os fármacos utilizados como terapêutica para o tratamento da LT apresenta uma série de problemas, incluindo resistência do parasito, indução de efeitos colaterais e abandono dos pacientes por serem medicamentos de administração parenteral (Silva-López 2010).

A necessidade de tratamentos com maior eficácia e segurança vem estimulando pesquisas com produtos naturais de plantas com atividade antileishmania, uma vez que os vegetais possuem uma diversidade química de metabólitos secundários estruturalmente únicos. No Brasil, estudos com produtos naturais têm mostrado também o potencial de substâncias e óleos obtidos de espécies encontradas no país. Atividade antileishmania foi detectada em benzofenonas preniladas isoladas de *Garcinia brasiliensis* (Pereira *et al.* 2010). Trabalhos anteriores do Grupo de nosso de pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) mostrou inibição do crescimento *in vitro* de *L.(Viannia) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* (Cortez 2004; Falcão 2010).

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo geral avaliar em modelo *in vivo*, utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*), a atividade de formulações tópicas contendo o extrato metanólico de *Libidibia ferrea*, uma planta nativa da região Amazônica, no tratamento da forma cutânea da Leishmaniose. Os objetivos específicos incluem avaliar a evolução clínica e o volume da lesão resultante da infecção de hamsters com *L. (L.) amazonensis* após tratamento tópico com formulações contendo ou não o extrato de *L. ferrea* e verificar após o período de tratamento a viabilidade parasitária, o grau de parasitemia.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Cultivo de Leishmania** - Foram utilizadas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHO/BR/2006/IM5584), cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) e a 24°C.

**Animais experimentais** - O modelo biológico experimental para o estudo foram 30 hamsters (*Mesocricetus auratus*) adultos (acima de 90 dias), machos e pesando equivalente a 200g. Os animais foram provenientes do Biotério do INPA, e o procedimento para o tratamento dos animais infectados ocorreu nas dependências do próprio Biotério. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno em condições adequadas a sua manutenção, com dieta e água *ad libitum*. O projeto foi submetido à comissão de ética dos animais, com o número de protocolo 009/2012.

**Procedimentos para o tratamento tópico** - Foram inoculados 10<sup>6</sup> mL do parasito na forma promastigota de *L. amazonensis* recém-isoladas em cultivo de amastigotas provenientes de lesões de hamsters, aplicados no focinho para a experimentação. Após a inoculação, os animais foram separados e agrupados em gaiolas identificadas.

O delineamento para a avaliação biológica foi determinado com a experimentação, formando-se quatro grupos recebendo tratamento e um controle negativo, levando em consideração que em cada grupo havia seis animais.

As formulações utilizadas continham extratos de *L. ferrea* (EMX 1), formulação placebo (EMX 2), formulação com extrato de *L. ferrea* e eplicações parenterais com Glucantime® (EMX 3) e o controle positivo com aplicações parenterais com Glucantime®.

As formulações foram aplicadas uma vez ao dia, 50 mg/aplicação/ animal, na área e proximidades da lesão. A área total das lesões foi aferida diariamente com um paquímetro e registradas. O aspecto morfológico das lesões foi analisado e acompanhado a sua evolução diária, sendo registrado em foto documento.

Os animais foram eutanasiados com Euthanyle® (Pentobarbital sódico – Difenilhidantoina sódica), de acordo como indicado pela comissão de ética animal do INPA.

Após a eutanásia dos animais, as lesões foram tricotomizadas e desinfetadas com solução salina e Gentamicina®. Em seguida, os segmentos da lesão no eixo longitudinal foram seccionados com bisturi. Foram transferidos segmentos de tecido para solução salina + Gentamicina® e criopreservação; solução de glutaraldeído 3,0% em tampão fosfato (para análise em Microscopia eletrônica de transmissão/MET); solução salina estéril e posterior inoculação em tubos com meio de cultura NNN (Novy e McNeal 1904; Nicolle 1908) e segmento para impressão em lâmina.

Os tubos de cultura com meio NNN foram incubados em estufa a 25 °C durante 7 dias, e após esse período foi investigada a presença de promastigotas viáveis nos meios, utilizando microscópio óptico.

As lâminas contendo impressão das lesões foram fixadas com metanol (PA) durante um minuto e em seguida, coradas durante duas horas utilizando o corante Giemsa. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente e então secas a temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica para verificar a presença de amastigotas em macrófagos e retirou-se uma média dessa relação entre número de parasitos no interior das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) pelo seu número encontrado nos vinte e cinco campos analisados, para a realização da avaliação de carga parasitária dos grupos dessa experimentação através do uso do Microscópio óptico numa resolução 1000x.

Para a quantificação parasitária em meio fase líquido de crescimento, será utilizado o método de Buffet et al. (1995) modificado, no qual os segmentos da lesão, após a remoção, pesagem e homogeneização em meio Schneider suplementado com 20% SFBi, é diluído serialmente em condições estéreis, em triplicata, em placas de 96 poços contendo 225 µL de meio de cultura. Após um período de sete dias de incubação a 25 °C, as placas foram examinadas em microscópio invertido e realizada a titulação final correspondente à última diluição no poço que apresentasse ao menos uma forma parasitária. O número de parasitos por grama foi calculado do seguinte modo: Número de parasitos/g = média da titulação positiva recíproca de cada triplicata/ peso da lesão.

Os dados registrados (tamanho da lesão por animal/dia e a quantidade de amastigotas contados por campo nas lâminas coradas com Giemsa) provenientes dos resultados das aferições das lesões foram inseridos em um banco de dados previamente elaborado no programa *GraphPadPrism* versão 6 e em seguida, analisados estatisticamente através de teste Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey, utilizando limite de 95% de confiança para verificar a diferença entre os grupos de tratamento para estes dois parâmetros analisados.

As formulações foram preparadas segundo metodologia confidencial, vinculadas ao projeto parceria e acordo Internacional entre o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e a Universidade de Helsinki, pelo programa VAIKUTUS – FP7 – PEOPLE – IRSES – 295262.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 30 dias da inoculação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os hamster apresentaram lesão característica de leishmaniose na forma cutânea na região do focinho, mostrando um aumento no volume da região.

Habitualmente são utilizados camundongos ou hamsters jovens e pré-púberes em ensaios biológicos *in vivo* para a Leishmaniose, pois estes são mais suscetíveis a infecção (Lima 2008). Quanto a inoculação esta pode ser realizada em diferentes partes do corpo como, na base da cauda por via intradérmica (Rodrigues 2012), no coxim plantar (Eissa *et al.* 2011) ou até mesmo no focinho, local definido para os experimentos do presente projeto.

Segundo Suman e Nishi (2011), através dos modelos animais é possível verificar a atividade de drogas em relação à absorção, distribuição, metabolismo e excreção e para dar uma indicação inicial da toxicidade, embora nenhum reproduza com precisão o que acontece nos humanos.

Após os vinte e cinco dias de tratamento pode-se avaliar o aspecto (macroscópico) clínico das lesões dos hamsters de todos os grupos, e determinar uma comparação entre eles. Os animais do grupo EMX 1 apresentaram uma lesão de forma nodular no início. Durante e após o tratamento e apresentou uma crosta na área da lesão e não foi observada uma redução da lesão como se esperava. Os animais do grupo EMX 2 também apresentaram lesões nodulares no início do tratamento. Durante e após o tratamento apresentaram na lesão uma úlcera de tamanho relativamente pequeno. Os animais do grupo EMX 3 apresentaram lesões nodulares no início, durante e após o tratamento, mas não houve uma redução das lesões nos animais. Os animais do grupo controle positivo apresentaram lesões nodulares no início, durante e após o tratamento, mas não se obteve uma redução considerável como se esperava pelo fato de ser um tratamento padrão utilizado em humanos (Brasil 2010). Os animais do grupo controle negativo apresentaram lesões nodulares no início do tratamento. Durante e após o tratamento as lesões se agravaram e apresentaram características ulcerosas e com infecções secundárias (Figura 1).

## Evolução da lesão durante o Tratamento

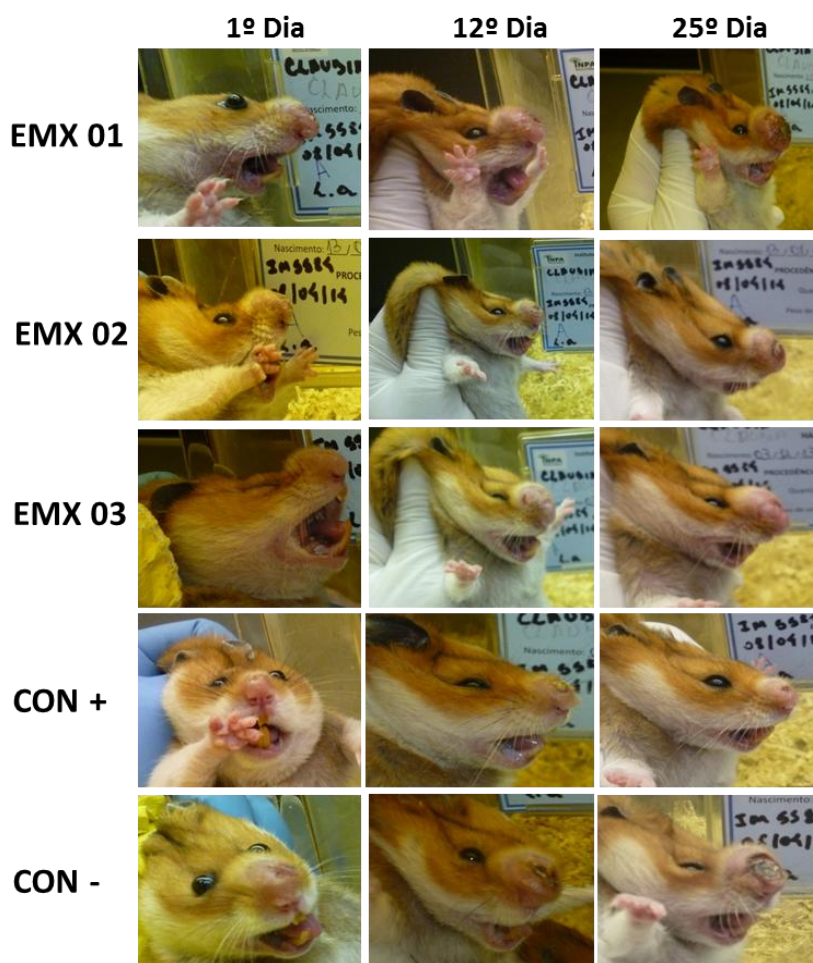


Figura 1. Evolução clínica (observação macroscópica) das lesões em focinho de *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em diferentes fases do estudo de tratamento tóxico. EMX1, EMX2 e EMX3 formulações utilizadas em sigilo científico; CON+ = tratamento com Glucantime®; CON- = grupo com ausência de tratamento.

Os fragmentos das lesões provenientes dos animais de todos os grupos que foram semeados em meio NNN para verificação de parasitos viáveis com grau de infectividade. Todos os grupos apresentaram formas amastigotas fusiformes e viáveis, no entanto somente nos grupos EMX 2, CON+ e CON- foram observadas rosetas nos cultivos com sete de dias de incubação.

A aferição diária dos volumes dos focinhos, registradas no decorrer do tratamento dos animais permitiu calcular as médias dos volumes das lesões e conseqüente avaliação da significância estatística. Pode-se observar que a partir do 13º dia o grupo CON+ demonstrou significância estatística. O grupo EMX 3 apresentou significância estatística a partir do 17º dia. O grupo EMX 2 apresentou significância estatística a partir do 19º dia. O grupo EMX 1 apresentou significância estatística a partir do 20º dia, segundo o teste Anova e Tukey com parâmetro de  $p < 0,05$  referente ao grupo CON- (Figura 2).

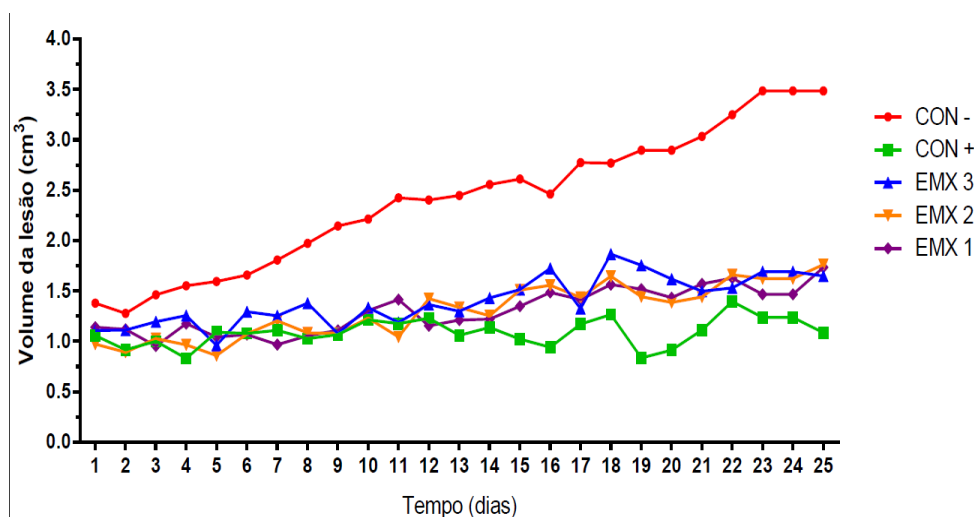


Figura 2. Evolução clínica do volume da lesão em *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* durante o tratamento com as formulações tópicas e Glucantime®.

## CONCLUSÃO

Após a análise e discussão dos resultados obtidos na avaliação das formulações, pode-se concluir que houve diferença no aspecto clínico entre os grupos tratados com formulações tópicas em relação ao controle, porém a análise parasitológica demonstrou a presença de uma grande quantidade de parasitas viáveis. Estes fatos demonstram a necessidade da continuidade dos estudos com as formulações tópicas contendo princípios ativos, com maior tempo de experimentação e frações mais purificadas do extrato de *L. ferrea*, além da inclusão de outros parâmetros farmacológicos a serem estudados. Este estudo experimental sugere a necessidade da continuidade do tratamento, mesmo no grupo com a droga padrão. Sendo assim é de extrema necessidade o aperfeiçoamento de uma formulação contendo uma ou mais substâncias bioativas que venham contribuir para um tratamento mais eficaz e com redução dos efeitos colaterais.

## REFERÊNCIAS

- Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; DenBoer, M. 2012. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and global estimates of its incidence. *PLoSOne*, 7: 35671.
- Brasil. 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde.
- Buffet, P.A.; Sulahian, A.; Garin, Y.J.F.; Nassar, N.; Derouin, F. 1995. Culture Microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Journal American Society for Microbiology*, 39: 2167-2168.
- Cortez, A. C. 2004. Avaliação da atividade in vitro dos extratos fitoquímicos de *Libidibia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales – Libidibiaceae) para *Leishmania* spp. e *Trichophyton* spp. Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 86 pp.
- Eissa, M.M.; AMER, E.I.; EL SAWY, S.M.F. 2011. *Leishmania major*: Activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 128: 382-390.
- Falcão, N. M. S. 2010. Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e análise de frações semi-purificadas de *Libidibia ferrea* Martius (Fabales: Libidibiaceae). Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Amazonas, Manaus, Amazonas. 83pp.
- Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1): 71-80.
- Lima, L.F.A. 2008. A Influência do Gênero e da Infecção materna na resposta à *Leishmania braziliensis* em filhotes de hamster. Dissertação de Mestrado em Patologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 52 pp.
- Neves, D.; Melo, A.; Linardi, P.; Victor, R. 2005. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo. Atheneu, 2005. 47 pp.
- Nicolle, G.L. 1908. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C.R. Acad. Sci.*, 146: 842-843.
- Novy, F.G.; MacNeal, W.J. 1904. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J. Infect. Dis.* 1: 1-30.

- Rodrigues, L.F. 2012. *Avaliação da atividade in vivo do antimoniato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre Leishmania (Viannia) braziliensis isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea*. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, 91p.
- Silva-López, R.E. 2010. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova*, 33: 1541-1543.
- Suman, G.; Nishi. 2011. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug Discovery. *Indian J Med. Res.*, 133: 27-39.