

## ESTUDO IN VIVO DE NOVAS FORMULAÇÕES CONTRA INFECÇÃO CAUSADA POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Camila Silva SANTOS<sup>1</sup>  
Fabiane Veloso SOARES<sup>2</sup>  
Antonia Maria Ramos FRANCO<sup>3</sup>

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

### INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana consiste em uma doença infecciosa e não contagiosa, de transmissão vetorial com apresentação polimórfica de peles e mucosas, e é causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo as mais frequentes no Brasil a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Penna *et al.* 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).

Deve-se ter em conta que a maioria dos casos ocorre em áreas geográficas de difícil acesso, o que dificulta tanto a aplicação parenteral da droga como o monitoramento de seus efeitos colaterais (Basano e Camargo 2004). Além disso, tem sido relatada a crescente existência de cepas resistentes de *Leishmania* aos antimoniais pentavalentes (Launois *et al.* 2008). Esse aumento crescente pode ser complicado pela interação do fármaco com a resposta imune do hospedeiro, variações na farmacocinética e sensibilidade das espécies de *Leishmania* aos componentes do fármaco (Frézard e Demicheli 2010).

Frente às dificuldades encontradas no tratamento das leishmanioses, surge a necessidade de pesquisas por novos fármacos e/ou busca de novos tipos de tratamento para todas as formas da doença.

Baseado nos efeitos colaterais, na dificuldade de acesso aos profissionais de saúde para administração desses medicamentos durante o tratamento, se faz necessário um estudo que possa indicar um novo medicamento e determinar as formulações mais promissoras para a continuidade de estudos *in vivo*. 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  $10^6$ /mL de parasitas (MHOM/BR/09/IM 5584 – *L. (L.) amazonensis*) na forma promastigota recém isolada. O delineamento para a avaliação biológica foi determinado em experimentação, o qual continha seis grupos recebendo tratamento (GExp) e um grupo controle negativo (GCN /sem tratamento) (Figura 1).

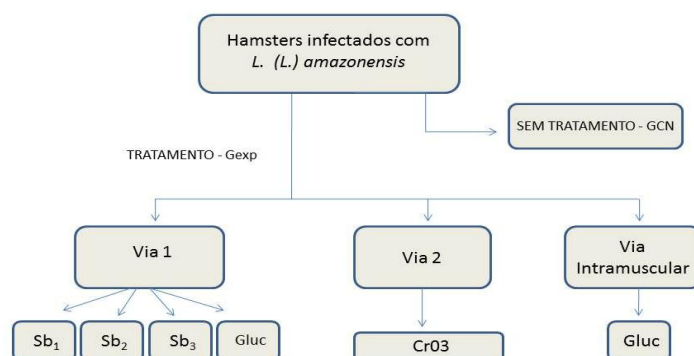


Figura 1. Delineamento Experimental. Sb: substâncias utilizadas em sigilo científico e Gluc =Glucantime®.

Foram utilizadas quatro formulações (Sb1, Sb2, Sb3 e Cr03) 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 5mL contém 405 mg de antimônio pentavalente, correspondendo a 81mg/mL. As formulações foram aplicadas na lesão uma vez ao dia/animal por 20 dias, com um intervalo de dois dias por semana. Abaixo protocolo de tratamento:

Formulação	Volume	Via de administração
Sb1	0,4 mL	Via 1
Sb2	0,4 mL	Via 1
Sb3	0,4 mL	Via 1
Cr03 + Sb3	60mg/ 0,4mL	Via 2 e via 1
Glucantime®	20mg/kg/dia (0,15mL)	Intramuscular (IM)
Glucantime®	0,4 mL	Via 1

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 a redução no tamanho das lesões cutâneas com as formulações Sb1, Sb2 e Sb3 em comparação ao GCN. 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.

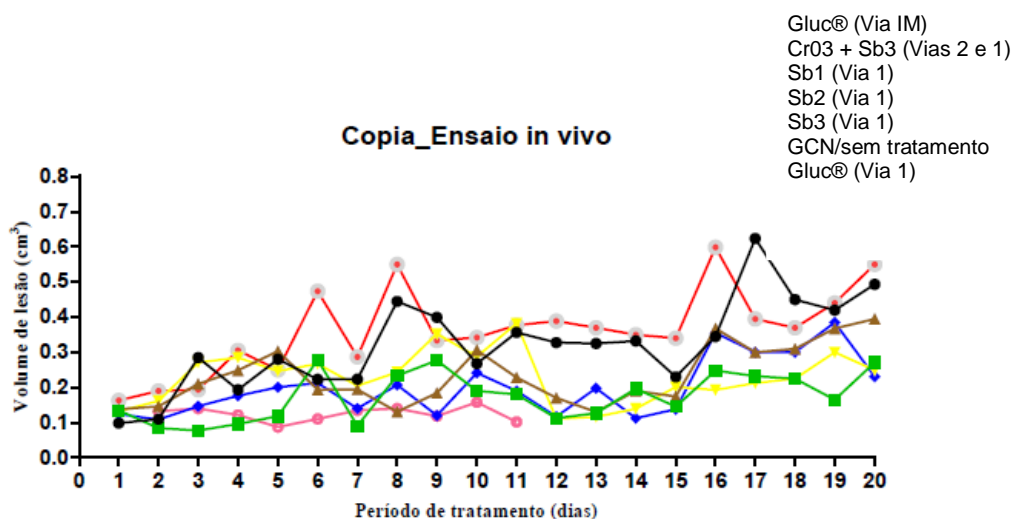


Figura 2. Evolução do tamanho das lesões cutâneas de hamsters infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, tratados por vias 1, 2 e intramuscular por 20 dias e grupo sem tratamento (GCN).

Ainda observando a figura 2, se percebe também uma redução significativa no tamanho da lesão cutânea dos animais submetidos ao tratamento com CrO3 quando comparado ao GCN, mantendo-se ao longo de todo experimento ao associar vias distintas de tratamento (vias 2 e 1). Diferente desse resultado, Sampaio e Filho (2009) descrevem que a associação N-metil glucamina e azitromicina não demonstrou mais eficácia do que o N-metil glucamina em uso isolado. Estudos recentes têm mostrado o potencial terapêutico de associações de fármacos com eficácia já comprovada. Esses estudos mostraram que as associações podem acelerar a resolução das lesões e potencializar a eficácia do tratamento diminuindo suas doses e conseqüentemente sua toxicidade (Aguiar *et al.* 2009).

No entanto, o grupo tratado com Glucantime® por via intramuscular (IM), necessita de maior tempo de tratamento, pois não demonstrou efetiva resposta quando se avaliam os tamanhos das lesões cutâneas comparado ao GCN. Existe relato de cepa de *L. (V.) braziliensis* que é considerada pela OMS uma cepa sensível ao antimônio pentavalente (Yardley *et al.* 2006) e uma curva dose-resposta foi realizada e observou-se que a evolução no tamanho das lesões nos animais tratados com a dose de 20mgSb<sup>V</sup>/Kg/dia foi semelhante àquela verificada nos animais que não receberam tratamento.

Quanto ao grupo tratado com Glucantime® por via 1, nota-se diminuição significativa do tamanho da lesão quando comparado aos outros grupos nos primeiros 10 dias de tratamento, não sendo possível o acompanhamento até o final do tratamento devido óbito dos animais desse grupo, o óbito desses animais pode ter ocorrido devido a alta concentração da droga na região da aplicação e toxicidade. Estudo como de Yépez *et al.* (1999) relatam que hamsters tratados durante 20 dias com Glucantime® por via intramuscular mostrou uma diminuição da lesão e que com Glucantime® por via local, a redução das lesões foram notavelmente inibidas.

Nova abordagem terapêutica como o uso do dispositivo de tatuagem para melhor direcionar a entrega da droga, tem sido utilizada no tratamento experimental da doença, demonstrando 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 a eficácia das formulações testadas no tratamento de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*, pois houve redução no volume das lesões, ainda que essas apresentem parasitas viáveis após tratamento.

Em toda seqüência para análise dos tratamentos observou-se a eficácia superior das formulações Sb2, Sb3 e a associação CrO3/Sb3 em comparação com os outros tratamentos, todas com significância estatística ( $p < 0,0001$ ).

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

Aguiar, M.G.; Silva, D.L., Nunan, F.A.; Nunan, E.A.; Fernandes, A.P.; Ferreira, L.A. 2009. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6): 1234-40.

Basano, S.A; Camargo, L.M.A. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7: 328.

Chakravarty, F.; Jundar S. 2010. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*.

Filho, AVC.; *et al.* 2008. Estudo comparativo entre Miltefosine 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): 424-27.

Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R.R. 2009. Pentavalent Antimonials: New Perspectives For Old Drugs. *Molecules*. 30(14) :2317-36.

Launois, P.; Tacchini-Cottier, F.; Kieny, M.P. 2008. Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 7(8): 1277-1287.

Oliveira-Silva F.; *et al.* 2010. Avaliação da sensibilidade *in vitro* de *Leishmania* ssp. Isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. In: 24ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 12ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. Uberaba, MG, Brasil.

- Penna, G.O.; Domingues, C.M.A.S.; Siqueira, J.B. Jr.; Elkhoury, A.N.S.M.; Cechinel, M.P.; Grossi, M.A.F.; Gomes, M.L.S.; Sena, J.M.; Pereira, G.F.M.; Júnior, F.E.F.L.; Segatto, T.C.V.; de Melo, F.C.; Rosa, F.M.; Silva, M.M.; Nicolau, R.A. 2011. Doenças dermatológicas de notificação compulsória no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86 (5): 865-877.
- Reithinger, R.; *et al.* 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, 7: 581-596.
- Sampaio, R.N.R.; Filho, A.V.C. 2009. O uso da associação de azitromicina e N-metil glucamina no tratamento de leishmaniose cutânea causada por *L.amazonensis* em camundongos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 84: 125-28.
- 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.