

AValiação CITOTÓXICA DO TRATAMENTO PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA COM GLUCANTIME® INTRAPERITONEAL EM CAMUNDONGOS BALB/C

Nathália Martins Franzoi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Aline Ávila Brustolin, Áquila Carolina Fernandes Herculanos Ramos-Milaré, Cíntia Akemi Tanoshi, Thaís Gomes Verzignassi Silveira, e-mail: tgvsilveira@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/ Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#): Imunologia e Imunologia Aplicada.

Palavras-chave: *Leishmania*, antimoniato de meglumina, modelo animal.

Resumo

Em estudos de novos compostos com atividade anti-*Leishmania in vivo*, a anfotericina B é retratada na literatura como controle de tratamento. Entretanto, isso não ocorre com o Glucantime®. Neste contexto, este estudo prioriza a avaliação citotóxica do tratamento com Glucantime® intraperitoneal em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* para uso como grupos controle em experimentos de teste de substâncias naturais e sintéticas na leishmaniose tegumentar. Foram utilizados 48 camundongos BALB/ c divididos em seis grupos, tratados com Anfo B (5 mg/Kg/dia) e diferentes concentrações de Sb⁺⁵, avaliados semanalmente quanto ao peso, comportamento, aparência dos pelos e evolução da lesão com medidas de volume e espessura das patas. Duas semanas após o tratamento, fez-se eutanásia e testes bioquímicos para avaliação da toxicidade. Os achados bioquímicos não revelaram toxicidade, apenas efeitos colaterais já conhecidos na literatura. A concentração de Sb⁺⁵ usual no tratamento de LT em humanos (20 mg/Kg/dia), não foi efetiva para o tratamento de animais de laboratório. Outros estudos estão em andamento para verificação da toxicidade e definição da melhor concentração de Glucantime® para uso como grupo controle em experimentos de teste de substâncias naturais e sintéticas para LT.

Introdução

O tratamento para as leishmanioses tem como primeira opção os antimoniais pentavalentes (Sb⁺⁵), como o Glucantime®, e como segunda opção a Anfotericina B (Anfo B) (Ministério da Saúde, 2017). O uso da Anfo B como controle de tratamento em estudos de novos compostos com atividade anti-*Leishmania in vivo* já é conhecido (Mello et al., 2015), porém isso não ocorre com o Glucantime®, já que os estudos que o usam em grupos controle de tratamento são restritos e utilizam uma faixa muito ampla de concentrações, que na maioria das vezes não levam à cicatrização da lesão (Morais-Teixeira et al., 2015). Ademais, encontra-se na literatura que o metabolismo de camundongos é acelerado em relação ao dos humanos (Andrade et al., 2013). Assim, é necessário usar concentrações elevadas de Glucantime® em camundongos, a fim de se obter os mesmos efeitos que são

encontrados em humanos, levando em consideração os efeitos citotóxicos. Este trabalho teve como objetivo a avaliação da citotoxicidade do tratamento com Glucantime® intraperitoneal em camundongos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* para uso como grupos controle em experimentos de teste de substâncias naturais e sintéticas para LT. Até onde é de nosso conhecimento, não há na literatura estudos de padronização do tratamento com Glucantime® intraperitoneal em animais de laboratório de modo que possam ser usados como grupos controles nos estudos sobre tratamento de leishmanioses.

Materiais e métodos

Animais: foram utilizados 48 camundongos BALB/c fêmeas com aproximadamente 8 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM), com aprovação do Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em experimentação (CEUA) da UEM (nº 5621311017). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com água e ração padronizadas *ad libitum*, com temperatura ambiente controlada e luz com ciclos de 12 horas claro/ escuro.

Infecção: Os animais foram anestesiados e infectados subcutaneamente na pata posterior direita com 1×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em 40 µL de PBS, o mesmo volume de PBS foi aplicado na pata posterior esquerda para controle.

Tratamento: os animais foram divididos em 6 grupos de 8 animais cada: 1) grupo controle negativo de infecção (animais não infectados e não tratados); 2) controle positivo de infecção (animais infectados e não tratados); 3) controle de tratamento com Anfo B (5 mg/kg/dia); 4) tratamento com 20 mg Sb⁺⁵/kg/dia; 5) 100 mg Sb⁺⁵/kg/dia; e 6) 200 mg Sb⁺⁵/kg/dia. O tratamento perdurou 30 dias consecutivos, uma dose ao dia, por via intraperitoneal, exceto grupo com anfotericina B com 20 dias. Os animais foram monitorados, semanalmente, quanto ao peso, comportamento, aparência dos pelos (lisos ou eriçados) e evolução da lesão com medidas de volume (pletismômetro) e espessura (paquímetro) das patas.

Avaliação bioquímica: o sangue foi coletado após anestesia (duas semanas após o tratamento), por punção cardíaca e testes bioquímicos foram realizados com kits comerciais utilizando o Vitalab Selecta 2 para avaliar os níveis de: glicose, creatinina, uréia, fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Eutanásia: duas semanas após o tratamento os animais foram anestesiados com isoflurano e posteriormente eutanasiados na câmara de dióxido de carbono (CO₂), conforme as diretrizes vigentes.

Análise estatística: A análise estatística foi realizada de acordo com a normalidade de distribuição dos dados com o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Todos os grupos de estudo apresentaram ganho de peso ao final do tratamento ($p < 0,05$). O grupo de animais tratados com Anfo B e o tratado com Sb⁺⁵ 20 mg/Kg/dia apresentaram diminuição significativa de peso, após 10 dias de tratamento, em relação ao controle positivo de infecção ($p < 0,05$).

Testes bioquímicos também foram realizados. Todos os grupos infectados apresentaram aumento nos níveis de uréia em relação ao controle negativo de infecção ($p < 0,05$), o que é esperado em processos infecciosos. Os animais tratados com Anfo B foram os únicos a apresentarem diminuição dos níveis de glicose e aumento dos níveis de AST em relação ao controle negativo de infecção ($p < 0,05$). Estes achados corroboram com a diminuição de peso, irritabilidade, queda acentuada de pelos e fezes amolecidas observados nesse grupo de animais. Esses efeitos adversos são comuns no tratamento em humanos e é previsto na bula do medicamento (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda., São Paulo, Brasil).

Os animais tratados com as diferentes concentrações de Sb^{+5} (20, 100 e 200 mg/Kg/dia) apresentaram diminuição nos níveis séricos de creatinina, que está correlacionado com a perda de massa muscular desses animais, o que também é previsto pelo fabricante (Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil). Nenhum desses achados revelam toxicidade, hepática ou renal, dos tratamentos empregados neste estudo.

Animais tratados com Anfo B, uso conhecido como controle de tratamento *in vivo* para LT (Mello et al., 2015), ou com Sb^{+5} na concentração de 20 mg/Kg/dia, usual no tratamento em humanos (Ministério da Saúde, 2017), não apresentaram diferenças significativas do controle positivo de infecção em relação aos parâmetros de volume e espessura das patas ($p > 0,05$), demonstrando que estas concentrações não são eficazes no tratamento da LT (Figura 1). Animais tratados com 200 mg Sb^{+5} /Kg/dia exibiram diminuição significativa das patas a partir do 17º dia de tratamento ($p < 0,05$). No entanto esta concentração causou irritabilidade nos animais se comparada a concentração de 100 mg/Kg/dia que diminuiu significativamente as patas dos animais uma semana após o tratamento ($p < 0,05$) (Figura 1).

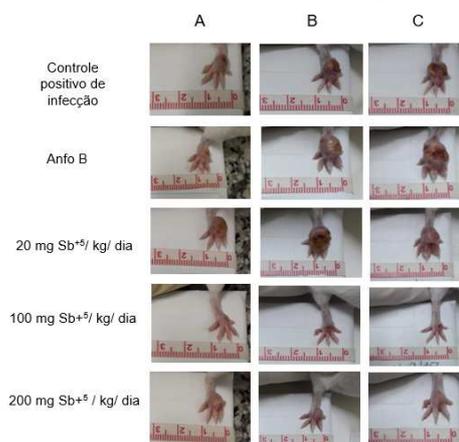


Figura 1. Avaliação da progressão das lesões. Aspecto das patas infectadas com 1×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* antes do tratamento (A), no 30º dia de tratamento (B) e 15 dias após o final do tratamento (C). Controle positivo de infecção (animais infectados e não tratados), Anfo B 5 mg/Kg/dia (tratamento por via intraperitoneal durante 20 dias) e grupos tratados com 20, 100 e 200 mg Sb^{+5} /Kg/dia (tratamento por via intraperitoneal durante 30 dias).

Conclusões

Os achados bioquímicos não revelam toxicidade, hepática ou renal, apenas efeitos colaterais já conhecidos na literatura. Avaliações histológicas de fígado e

baço estão em andamento para verificar possíveis focos inflamatórios. A concentração de Sb⁺⁵ usual no tratamento de LT em humanos, não é efetiva para o tratamento de animais de laboratório. Ademais, avaliações histológicas das lesões e a determinação da carga parasitária de gânglios poplíteos e baço serão analisadas para definir a melhor concentração de Glucantime[®] para uso como grupo controle em experimentos de teste de substâncias naturais e sintéticas para LT.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq por essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Referências

1. Andrade C, Haas SE, Costa TD, Araujo BV. **Comparação do metabolismo interespecies dos principais anticonvulsivantes usados na prática clínica.** Rev. Bras. Farm. 94 (3): 321 – 330, 2013.
2. Mello TFP, Cardoso BM, Lopes SN, Bitencourt HR, Voltarelli EM, Hernandez L, et al. **Activity of synthetic chalcones in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** Parasitology Research. 144(10): 3587–3600; 2015.
3. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ªed. Brasília: Editora MS; 2017.
4. Morais-Teixeira E, Aguiar MG, Lima BSS, Ferreira LAM, Rabello A. **Combined suboptimal schedules of topical paromomycin, meglumine antimoniate and miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 70(12):3283–3290; 2015.