

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

JACKSANDRA FARIAS DE FRANÇA CAMPOS

AÇÃO LEISHMANICIDA *IN VITRO* DA MILTEFOSINE EM FORMAS
PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*, *LEISHMANIA*
(VIANNIA) GUYANENSIS, *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* E ESTUDO *IN VIVO*
DE SUA EFICÁCIA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
EXPERIMENTAL.

BRASÍLIA-DF

2008

JACKSANDRA FARIAS DE FRANÇA CAMPOS

AÇÃO LEISHMANICIDA *IN VITRO* DA MILTEFOSINE EM FORMAS
PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*, *LEISHMANIA*
(VIANNIA) GUYANENSIS, *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* E ESTUDO *IN VIVO*
DE SUA EFICÁCIA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
EXPERIMENTAL.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: LEISHMANIOSE.

ORIENTADORA: RAIMUNDA NONATA RIBEIRO SAMPAIO.

BRASÍLIA-DF

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Campos, Jacksandra Farias de França, 1974-

Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental / Jacksandra Farias de França Campos. - 2008.

80 f. : il. color. ; 29.7 cm

Orientadora: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.

Dissertação – Universidade de Brasília, Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2008.

1. Leishmaniose. 2. Tratamento. 3. Miltefosine. I. Sampaio, Raimunda Nonata Ribeiro. II. Universidade de Brasília. Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental.

C198a

CDU 616.993.161

JACKSANDRA FARIAS DE FRANÇA CAMPOS

ACÇÃO LEISHMANICIDA *IN VITRO* DA MILTEFOSINE EM FORMAS
PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*, *LEISHMANIA*
(VIANNIA) GUYANENSIS, *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* E ESTUDO *IN VIVO*
DE SUA EFICÁCIA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
EXPERIMENTAL.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: LEISHMANIOSE.

APROVADA POR:

Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, doutora, Universidade de Brasília.

Albino Verçosa de Magalhães, doutor, Universidade de Brasília.

Cleudson Nery de Castro, doutor, Universidade de Brasília.

BRASÍLIA/DF, 28 DE NOVEMBRO DE 2008

Dedico este trabalho à minha filha, ao meu esposo e à minha mãe. Eles são o meu alicerce e a minha fonte de inspiração na busca de novos desafios e crescimento.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio pela confiança depositada em mim, pela orientação nesta pesquisa e por me fortalecer nos momentos de dificuldades;

À colega e amiga, doutoranda, Ada Urdapilleta, pelo convívio e ajuda em toda parte experimental da pesquisa e pela disponibilidade constante em auxiliar, ensinar e sugerir idéias no desenvolvimento do meu projeto;

Aos técnicos Tércio Rodrigues e Viviane Medeiros pela atenção e ajuda indispensáveis na realização prática dos experimentos;

Ao pessoal do laboratório de Imunologia da UnB, em especial à doutora Selma Silva, pelo suporte nas leituras do ensaio com MTT e pelas valiosas colaborações;

À Dra. Edna Ishikawa do Instituto Evandro Chagas de Belém-PA que gentilmente forneceu as cepas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* para o laboratório de Dermatologicologia;

Ao Dr. Sabine Engel, do laboratório alemão Zentaris, que nos forneceu gratuitamente a droga miltefosine para o desenvolvimento dessa pesquisa;

Ao pessoal do Departamento de Compras Internacionais da UnB, em especial ao José Geraldo, pela ajuda no recebimento da droga;

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina da UnB, que muito nos auxiliaram nos cuidados com os camundongos;

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UnB, pela ajuda com informações e orientações sobre os procedimentos do programa;

Aos colegas de pós-graduação, Killarney Soares e Gilcilene Santos pelos bons momentos, especialmente os de descontração;

À Izabel Cristina Silva, biomédica e estatística, pela ajuda nas análises estatísticas deste trabalho;

Aos colegas da faculdade JK/Anhanguera, pelas dicas e informações úteis na finalização desta dissertação;

Aos meus familiares: meus sogros, meu irmão e minhas cunhadas. Pela torcida e apoio no meu desenvolvimento profissional;

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram no decorrer deste trabalho;

À Universidade de Brasília.

RESUMO

A droga miltefosine é uma alquilfosfocolina de uso oral já usada na Índia no tratamento da leishmaniose visceral. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação *in vitro* e *in vivo* da droga no tratamento da leishmaniose cutânea experimental. Nos testes *in vitro* promastigotas metacíclicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* foram incubadas 48 horas na presença de diferentes concentrações de miltefosine (100 a 3,1µg/mL), N-metil glucamina (300 a 9,3µg/mL) e associação das duas drogas. A avaliação foi feita pelo método colorimétrico *Methyl Thiazolyl Blue*. No teste *in vivo*, 80 camundongos, cepa C57BL/6 foram infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e divididos em quatro grupos de tratamento (10 dias): miltefosine, N-metil glucamina, miltefosine+N-metil glucamina e controle sem tratamento. Doses: miltefosine via oral 20mg/kg/dia e N-metil glucamina intramuscular 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia. Avaliação: medição da pata e parasitológico (culturas em meio Novy-McNeal-Nicolle, esfregaços para pesquisas de amastigotas e culturas em diluição limitante). Análises estatísticas: programa SPSS[®] versão 13.0. Resultados *in vitro*: a concentração inibitória capaz de destruir 50% (IC₅₀) das promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi de 12,2µg/mL; para *Leishmania (Viannia) braziliensis* a IC₅₀ foi de 22,9µg/mL e para *Leishmania (Viannia) guyanensis* a IC₅₀ foi de 271,7µg/mL. Resultados *in vivo*: no grupo miltefosine as médias de diâmetro das patas caíram de 2,3 para 1,9 (*p*:0,004), no grupo controle as médias cresceram de 1,8 para 2,4 (*p*:0,001), nos grupos N-metil glucamina e miltefosine+N-metil glucamina não houve diferença estatística (*p*:0,407 e *p*:0,923). Nas culturas em meio Novy-McNeal-Nicolle e esfregaços para pesquisa de amastigotas os grupos miltefosine e miltefosine+N-metil glucamina tiveram as maiores porcentagens de exames negativos no pós-tratamento (*p*:0,017 e *p*:0,000). Nas culturas em diluição limitante não houve crescimento de formas promastigotas nos grupos miltefosine e miltefosine+N-metil glucamina. *In vitro* as promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* demonstraram sensibilidade ao miltefosine, sendo a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* a mais sensível e a *Leishmania (Viannia) guyanensis* a menos sensível. *In vivo* a droga se mostrou eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea experimental. Assim, conclui-se que a miltefosine parece ser uma droga potencial para o tratamento da leishmaniose cutânea no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania*. Miltefosine. Promastigotas. Leishmaniose cutânea.

ABSTRACT

Miltefosine is an oral hexadecylphosphocoline drug which has already been used for visceral leishmaniasis treatment in India. The objective of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* drug action as a treatment on a cutaneous leishmaniasis trial. On *in vitro* tests metacyclic promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* were incubated 48 hours into concentrations of miltefosine (100 to 3.1µg/mL), N-methyl glucamine (300 to 9.3µg/mL) and a combination of both drugs. The assessment was made by *Methyl Thiazolyl Blue* colorimetric method. On *in vivo* tests 80 mice, C57BL/6 strain were infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and divided into four treatment groups (10 days): miltefosine, N-methyl glucamine, miltefosine + N-methyl glucamine and control with no treatment. Dosage: oral miltefosine 20mg/kg/day and intramuscular N-methyl glucamine 400mg Sb⁺⁵/Kg/day. Evaluation: measurement of foot and parasitological (Novy-McNeal-Nicolle medium cultures, smears and cultures in limiting dilution). Statistical analysis: SPSS[®] software version 13.0. *In vitro* results: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* IC₅₀=12.2µg/mL; *Leishmania (Viannia) braziliensis* IC₅₀=22,9µg/ml and *Leishmania (Viannia) guyanensis* IC₅₀=271,7µg/mL. *In vivo* results: on miltefosine group the average diameter of the feet fell from 2.3 to 1.9 (*p*: 0.004), on control group the mean increased from 1.8 to 2.4 (*p*: 0.001), on the other two groups there were no statistical difference (*p*: 0.407 and *p*: 0.923). In cultures and smears the groups miltefosine and miltefosine + N-methyl glucamine had the highest percentages of negative tests in post-treatment (*p*: 0.017 and *p*: 0,000). In limiting dilution the miltefosine and miltefosine + N-methyl glucamine groups had no growth of promastigotes on crops after treatment. Promastigotes forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* had *in vitro* sensitivity to miltefosine (the first one had higher and the last one had lower sensitivity). The drug was effective *in vivo* in the treatment of cutaneous leishmaniasis trial. It's therefore concluded that miltefosine can be considered as a potential treatment for cutaneous leishmaniasis in Brazil.

KEYWORDS: *Leishmania*. Miltefosine. Promastigotes. Cutaneous leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da miltefosine.

Figura 2 - Forma flagelada ou promastigota de *Leishmania sp.*

Figura 3 - Forma aflagelada ou amastigota de *Leishmania sp.*

Figura 4 - Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da LTA, Brasil – 2005.

Figura 5 - Densidade de casos (2004) e circuitos de leishmaniose tegumentar americana por município, Brasil (2001 a 2003).

Figura 6 - Fórmula estrutural da N-metil glucamina.

Figura 7 - Fórmula estrutural da pentamidina.

Figura 8 - Fórmula estrutural da anfotericina B.

Figura 9 - Câmara de contagem adaptada para microscópio de campo claro ou de contraste de fases. A área de contagem das formas promastigotas é a marcada com L.

Figura 10 - Placa tipo ELISA fundo chato com 96 poços.

Figura 11 – Paquímetro.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição das médias do número de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). As barras representam duas vezes o erro padrão. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os dias. A seta indica o dia escolhido para realização dos experimentos.

Gráfico 2- Distribuição das médias do número de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). As barras representam duas vezes o erro padrão. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os dias. A seta indica o dia escolhido para realização dos experimentos.

Gráfico 3- Distribuição das médias do número de promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). As barras representam duas vezes o erro padrão. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os dias. A seta indica o dia escolhido para realização dos experimentos.

Gráfico 4- Comparação da distribuição das médias do número de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* segundo o tempo de crescimento das culturas (dias).

Gráfico 5 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (100 a 3,1µg/mL) de miltefosine (M). As barras indicam o erro padrão da média. M1= 100µg/mL; M2= 50µg/mL; M3=25µg/mL; M4= 12,5µg/mL; M5=6,7µg/mL; M6=3,1µg/mL.

Gráfico 6 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (300 a 9,3µg/mL) de N-metil glucamina (G). As barras indicam o erro padrão da média. G1=300µg/mL; G2=150µg/mL; G3=75µg/mL; G4=37,5µg/mL; G5=18,7µg/mL; G6= 9,3µg/mL.

Gráfico 7 - Distribuição da viabilidade celular de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações de miltefosine (M), N-metil glucamina (G) e M+G. As barras indicam o erro padrão da média. MG1=100+300µg/mL; MG2=50+150µg/mL; MG3=25+75µg/mL; MG4=12,5+37,5 µg/mL; MG5=6,7+18,7µg/mL; MG6=3,1+9,3µg/mL.

Gráfico 8 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) braziliensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (100 a 3,1µg/mL) de miltefosine (M). As barras indicam o erro padrão da média. M1=100µg/mL; M2=50µg/mL; M3=25µg/mL; M4=12,5µg/mL; M5=6,7µg/mL; M6= 3,1µg/mL.

Gráfico 9 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) braziliensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (300 a 9,3µg/mL) de N-metil glucamina(G). As barras indicam o erro padrão da média. G1=300µg/mL; G2=150µg/mL; G3=75µg/mL; G4=37,5µg/mL; G5=18,7µg/mL; G6= 9,3µg/mL.

Gráfico 10 - Distribuição da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) braziliensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações de miltefosine (M), N-metil glucamina (G) e M+G. As barras indicam o erro padrão da média. MG1=100+300µg/mL; MG2=50+150 µg/mL; MG3=25+75µg/mL; MG4=12,5+37,5µg/mL; MG5=6,7+18,7µg/mL; MG6=3,1+9,3µg/mL.

Gráfico 11 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) guyanensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (100 a 3,1µg/mL) de miltefosine (M). As barras indicam o erro padrão da média. M1=100µg/mL; M2=50µg/mL; M3= 25µg/mL; M4=12,5µg/mL; M5=6,7µg/mL; M6= 3,1µg/mL.

Gráfico 12 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) guyanensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (300 a 9,3µg/mL) de N-metil glucamina (G). As barras indicam o erro padrão da média. G1=300µg/mL; G2=150µg/mL; G3=75µg/mL; G4=37,5µg/mL; G5=18,7µg/mL; G6= 9,3µg/mL.

Gráfico 13 - Distribuição da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) guyanensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações de miltefosine (M), N-metil glucamina (G) e N+G. As barras indicam o erro padrão da média. MG1=100+300µg/mL; MG2= 50+150µg/mL; MG3=25+75µg/mL; MG4=12,5+37,5µg/mL; MG5=6,7+18,7µg/mL; MG6=3,1+9,3 µg/mL.

Gráfico 14 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos do grupo miltefosine (M) no pré-tratamento e após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias.

Gráfico 15 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos do grupo N-metil glucamina (G) no pré-tratamento e após tratamento com N-metil glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias.

Gráfico 16 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos do grupo miltefosine + N-metil glucamina (M+G) no pré-tratamento e após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia via oral e N-metil glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias.

Gráfico 17 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos do grupo controle (C) sem tratamento.

Gráfico 18 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos dos grupos miltefosine (M), N-metil glucamina (G), miltefosine+N-metil glucamina (M+G) e controle (C) no pré-tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística. As barras de erro representam duas vezes o erro padrão.

Gráfico 19 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos dos grupos miltefosine (M), N-metil glucamina (G), miltefosine+N-metil glucamina (M+G) e controle (C) no pós-tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística. As barras de erro representam duas vezes o erro padrão. M=grupo tratado com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias. G=grupo tratado com N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias. M+G= grupo tratado com a associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administração e tempo anteriores. C=grupo controle sem tratamento.

Gráfico 20 - Distribuição da porcentagem de culturas negativas e positivas feitas a partir da linfa das patas dos camundongos após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

Gráfico 21- Distribuição da porcentagem de esfregaços negativos e positivos feitos a partir da linfa das patas dos camundongos após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

Gráfico 22 – Número de parasitos por pata de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividade leishmanicida *in vitro* da miltefosine e N-metil glucamina contra formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Tabela 2- Resultado das culturas de *Leishmania* feitas a partir da linfa das patas dos camundongos após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

Tabela 3- Resultado da pesquisa de amastigotas nos esfregaços feitos a partir da linfa das patas dos camundongos após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD: demanda bioquímica de oxigênio

CEUA: Comitê de Ética no Uso Animal

DF: Distrito Federal

DNA: ácido desoxi-ribonucléico

ELISA: ensaio imunoadsorvente enzima-associado

FC: fixação de complemento

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IC₅₀: concentração inibitória da droga que induz 50% de lise ou morte celular

IDRM: Intradermorreação de Montenegro

LC: leishmaniose cutânea

LCD: leishmaniose cutânea-difusa

LM: leishmaniose mucosa

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: leishmaniose visceral

MS: Ministério da Saúde

MTT: metil tiazol tetrazólio

NMG: antimoniato de N-metil glucamina

NNN: Novy-McNeal-Nicolle

OMS: Organização Mundial de Saúde

p: coeficiente de correlação de Pearson

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

RIFI: imunofluorescência indireta

Sb⁺⁵: antimônio pentavalente

SDS: duodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3 OBJETIVOS	
3.1 GERAL	33
3.2 ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Tipos de estudo	34
4.2 Origens das cepas de <i>Leishmania</i>	34
4.3 Determinação das curvas padrão de crescimento	34
4.4 Ação leishmanicida <i>in vitro</i> da miltefosine sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	36
4.5 Estudo comparativo entre a miltefosine, N-metil glucamina e a associação da miltefosine com N-metil glucamina no tratamento de leishmaniose cutânea experimental	37
4.5.1 Avaliação da eficácia dos tratamentos	38
4.5.1.1 Medição da lesão cutânea (diâmetro das patas)	38
4.5.1.2 Exames parasitológicos	39
4.5.1.2.1 Culturas e esfregaços	39
4.5.1.2.2 Diluição limitante	39
5 RESULTADOS	
5.1 Determinação das curvas padrão de crescimento	40
5.2 Ação leishmanicida <i>in vitro</i> da miltefosine sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	42
5.3 Estudo comparativo entre a miltefosine, N-metil glucamina e a associação da miltefosine com N-metil glucamina no tratamento de leishmaniose cutânea experimental	52
5.3.1 Avaliação da eficácia dos tratamentos	52
5.3.1.1 Medição da lesão cutânea (diâmetro das patas)	52
5.3.1.2 Exames parasitológicos	56
5.3.1.2.1 Culturas e esfregaços	56
5.3.1.2.2 Diluição limitante	58
6 DISCUSSÃO	
6.1 Curvas de crescimento	59
6.2 Ação leishmanicida <i>in vitro</i> da miltefosine sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	60
6.3 Estudo comparativo entre a miltefosine, N-metil glucamina e a associação da miltefosine com N-metil glucamina no tratamento de leishmaniose cutânea experimental	62
6.4 Miltefosine	65
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

De 1.400 medicamentos lançados no mercado mundial nos últimos 25 anos, apenas 13 são usados para combater doenças tropicais. Isso ocorre, em parte, porque o público-alvo desses fármacos são geralmente populações rurais e de baixa renda, que não podem arcar com remédios de alto custo. Algumas dessas doenças são consideradas, dessa forma, negligenciadas e entre elas está a leishmaniose cutânea (LC). A importância desta para a saúde pública é evidente, já que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a cada 20 segundos uma pessoa se infecta e a mesma permanece endêmica em 82 países com 10 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2007).

O tratamento da leishmaniose foi introduzido pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, com o uso do tártaro emético, antimônio trivalente (VIANNA, 1912). Até hoje o antimônio é usado, principalmente na sua forma pentavalente, a N-metil glucamina (NMG). No Brasil, a NMG é a droga de primeira escolha para o tratamento dessa doença e foi padronizada pela OMS na dose 10 a 20mg Sb⁺⁵/Kg/dia, onde Sb⁺⁵ significa antimônio pentavalente (BRASIL, 2007; LIMA et al., 2007).

O tratamento com antimoniais, embora seja na maioria das vezes efetivo e indicado, apresentando taxa de cura que varia de 60 a 100%, possui algumas desvantagens como alto custo, difícil administração e alta toxicidade, podendo desencadear vários efeitos colaterais, como artralgia, mialgia, cefaléias, distúrbios gastrointestinais, alterações eletrocardiográficas, renais, hepáticas, pancreáticas, erupção cutânea, distúrbios da crase sangüínea, herpes-zóster e outros. Por isso, muitas vezes, esta droga é contra-indicada para cardiopatas, nefropatas, pessoas idosas e grávidas (NOGUEIRA; SAMPAIO, 2001; MAYRINK et al., 2006).

Além dos efeitos adversos, tem se observado com bastante frequência um aumento na incidência de insucesso, recidiva e resistência ao tratamento (GROGL et al., 1992 ; RODRIGUES et al., 2006). Algumas pesquisas buscam entender os fatores envolvidos nesses casos, a exemplo do estudo retrospectivo realizado por Conceição-Silva e colaboradores (2007) que analisou 15 pacientes com LC que tiveram falha na resposta terapêutica ao antimônio pentavalente. Foi concluído nesse estudo que o único fator comum nos pacientes com recidiva foi uma maior facilidade de detecção do parasito, diferentemente do grupo com sucesso terapêutico, e isto poderia indiretamente indicar que nestes casos haveria a presença de maior carga parasitária o que necessitaria de um maior tempo de tratamento.

Diante destes fatos, vários pesquisadores têm buscado novas alternativas de esquemas terapêuticos para o uso dos antimoniais utilizando doses menores e esquemas posológicos alternativos, visando obter resultados satisfatórios em casos resistentes ao esquema padrão e minimizar os efeitos colaterais (OLIVEIRA-NETO et al., 1997; OLIVEIRA-NETO et al., 2000; OLIVEIRA-NETO; MATTOS, 2006 (a)(b)).

As drogas de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana (LTA) são a anfotericina B e a pentamidina. Elas são utilizadas principalmente quando não ocorre uma resposta satisfatória com o uso do antimonial pentavalente.

Muito embora todas essas drogas estejam geralmente disponíveis nas unidades de saúde, o potencial hepatotóxico, cardiotoxico e nefrotóxico, principalmente do antimonial, aliado ao seu uso parenteral exclusivo, representa um sério obstáculo ao tratamento adequado dos casos (BASANO; CAMARGO, 2004).

Nesse contexto surge como uma nova promessa de tratamento a miltefosine (1-O-hexadecilfosfocolina). Essa droga é uma alquilfosfocolina (FIGURA 1) que foi originalmente desenvolvida para o tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários (HILGARD et al., 1993; VERMA; DEY, 2004). Posteriormente foi testada, com sucesso, no tratamento da leishmaniose visceral (LV) através de uma iniciativa da OMS reunindo um laboratório farmacêutico alemão e o Ministério da Saúde da Índia.

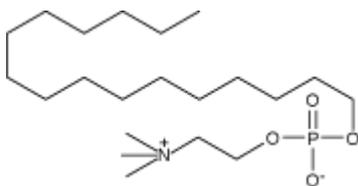


Figura 1 - Fórmula estrutural da miltefosine

(Fonte: <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/63280/a/z>)

Do seu mecanismo de ação sabe-se que primariamente interfere com a membrana celular, podendo ou não interagir com o DNA. Modula a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolípidos e a transdução do sinal proliferativo. Também induz morte celular por apoptose (MORE et al., 2003; PRAZAD et al., 2004).

Em formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* a miltefosine foi capaz de induzir o processo de morte celular por apoptose atuando no citoplasma, núcleo e

membrana das células, promovendo seu encolhimento, fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e exposição da fosfatidilserina (PARIS et al., 2004).

Atua também contra formas amastigotas (intracelulares) de *L. donovani*, agindo de forma mais complexa que nas promastigotas, envolvendo macrófagos ou ativando respostas de células T. Nesse caso são observadas as seguintes ações *in vitro*: co-estimulação de eventos relacionados à citocinas, incluindo expressão de RNAm, interferon (IFN- γ) e fator estimulador de colônia granulócito-macrófago; secreção de IFN- γ e fator- α de necrose tumoral; expressão de receptores de citocina na superfície e moléculas classe II do complexo principal de histocompatibilidade e induzindo ou incrementando a atividade de queima respiratória e a liberação de óxido nítrico (SUNDAR et al., 1998; JHA et al.; 1999; MURRAY; DELPH-ETIENE, 2000).

Com relação à farmacocinética da droga, um estudo recente realizado por Dorlo e colaboradores (2008) concluiu que a eliminação da miltefosine é muito lenta, sendo ainda detectável no plasma humano em amostras colhidas de 05 a 06 meses após o final do tratamento. A presença dessas concentrações sub-terapêuticas no sangue até 05 ou 06 meses depois do tratamento podem beneficiar sua eficácia, porém contribuem para a seleção de parasitos resistentes e ainda acarreta conseqüências para a toxicidade. Dessa forma, devem ser consideradas medidas para prevenir os riscos teratogênicos dessa droga.

Croft e colaboradores (1987) foram os primeiros pesquisadores a relatar ação antileishmania das alquilfosfocolinas e derivados. Nesse estudo eles observaram ação da miltefosine contra formas amastigotas de *L. donovani* após uso parenteral em camundongos BALB/c.

Considerando a boa biodisponibilidade oral da droga, evidente em estudos com doentes com tumores, Kulencord e colaboradores (1992) demonstraram pela primeira vez uma excelente atividade oral da miltefosine. Camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* foram tratados com a droga por via oral e os resultados obtidos, após quatro semanas de tratamento, foram superiores aos do antimonial. *In vitro*, formas promastigotas dessas mesmas espécies também apresentaram alta susceptibilidade com IC₅₀ (concentração inibitória da droga que induz 50% de lise ou morte celular) variando de 0,8 a 2,2 μ g/mL.

Outra pesquisa demonstrou que as alquilfosfocolinas, incluindo a miltefosine, são ativas contra *L. donovani* em culturas de macrófagos *in vitro* e em camundongos *scid* e BALB/c (ESCOBAR et al., 2001).

No entanto Santa-Rita e colaboradores (2004) demonstraram que as alquilgliceroalfosfocolinas (edelfosine e ilmofosine) foram mais ativas contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* do que a alquilfosfocolina, miltefosine.

A interação da miltefosine com outras drogas leishmanicidas como anfotericina B, paromicina e stibogluconato de sódio (antimonial pentavalente) também foi testada *in vitro* e *in vivo* e a pesquisa concluiu que houve sinergismo nas associações, nenhuma das drogas diminuiu a atividade da miltefosine e também não houve sinais de toxicidade com as combinações testadas (SEIFERT; CROFT, 2006).

Yardley e colaboradores (2005) pesquisaram a ação leishmanicida da miltefosine em formas amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose visceral (*L. donovani*) e leishmaniose cutânea (*Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Viannia) lainsoni*). Foi observada uma grande variação nas concentrações de miltefosine necessárias para matar 50% das formas amastigotas dessas diferentes espécies. As espécies de maior sensibilidade à ação da droga foram *L. donovani* e *L. lainsoni*. Isso demonstra uma notável diferença na sensibilidade intrínseca *in vitro* das espécies de *Leishmania* ao miltefosine.

Com relação aos ensaios clínicos, desde 1998 pesquisadores indianos vêm realizando estudos para avaliar a eficácia da miltefosine em pacientes com LV. Encontraram taxas de cura de aproximadamente 91% com doses de 2,5mg/kg/dia durante 28 dias no caso da LV (JHA et al., 1999). Posteriormente outros pesquisadores iniciaram pesquisas clínicas em pacientes com LC e observaram taxas de cura de 53% a 70% (SOTO et al., 2004; SOTO; SOTO, 2006; RAHMAN et al., 2007).

No tratamento da LTA com miltefosine a dose preconizada para adultos é de 100 a 150mg (2,5mg/kg) por dia, via oral, por 28 dias. As reações adversas geralmente se restringem ao trato gastrointestinal, como vômitos e diarreia, variam de 20 a 61% e normalmente não acarretam interrupção de terapia. É um medicamento teratogênico, devendo ser evitado o uso em gestantes (SUNDAR et al., 1998).

Em 2004, Soto e colaboradores concluíram um estudo multicêntrico e placebo-controlado usando a miltefosine no tratamento da LC na Colômbia e Guatemala. A droga foi bem tolerada e útil no tratamento da doença causada pela *Leishmania (Viannia) panamensis* na Colômbia, mas os resultados mostraram que contra a infecção causada por *L. braziliensis* na Guatemala não se mostrou tão útil quando comparada a resultados conhecidos dos antimoniais, embora tenha se mostrado mais eficaz que o placebo.

Em 2006, num estudo sobre LC em viajantes oriundos de países da América Latina, Schwartz e colaboradores mencionaram que a miltefosine falhou na cura de infecções causadas pela *L. braziliensis*.

Atualmente Soto e colaboradores desenvolvem um novo estudo randomizado na Bolívia para estabelecer de forma mais completa a eficácia e segurança da miltefosine no tratamento da LC e LM causada pela *L. braziliensis*. Os resultados encontrados até agora são opostos aos do estudo de 2004 e aos encontrados por Schwartz em 2006, onde a miltefosine tem alcançado taxas de cura de 85% para o tratamento da LC e 75% para a LM sendo considerada uma droga segura, com poucas reações adversas (SOTO; TOLEDO, 2007). Esse estudo vem corroborando com outros relatos de tratamentos bem sucedidos utilizando a droga, tanto para o tratamento da LC quanto para o da LM (ZANCANARO et al., 2007; WOHRL et al., 2008).

No tratamento da LCD a miltefosine já demonstrou eficácia (SCHRANER et al., 2005), porém com níveis de recidiva significativos, como mostrou um recente estudo realizado na Venezuela com 16 pacientes com LCD tratados com miltefosine. Nesse estudo a droga teve uma boa eficácia, com poucos efeitos colaterais, onde os pacientes apresentaram melhora clínica e diminuição da carga parasitária já com 15 dias após início do tratamento. Entretanto, os níveis de recidiva, com o aparecimento de novas lesões após a suspensão do tratamento, foram significativos (ZERPA et al., 2007).

Nos casos de co-infecção LV/HIV o tratamento com miltefosine não demonstrou eficácia semelhante a dos antimoniais (RITMEIJER et al., 2006; TROYA et al., 2007).

Na apresentação tópica a miltefosine apresenta diferentes resultados quanto à eficácia em estudos experimentais (SCHMIDT-OTT et al., 1999; SAMPAIO et al., 2007 (a)(b)).

Durante os últimos 10 anos novos agentes foram testados isoladamente ou em combinações para o tratamento da leishmaniose. Desde 2002 que a miltefosine encontra-se registrada na Índia para o tratamento da LV e sua identificação foi um importante avanço terapêutico por se tratar do primeiro agente oral realmente efetivo no tratamento dessa doença, também demonstrando uma boa atividade em LTA, embora seja variável de acordo com a espécie envolvida na patologia (SUNDAR et al., 1998; JHA et al., 1999; MURRAY; DELPH-ETIENE, 2000; SUNDAR et al., 2002; MURRAY, 2004; RAHMAN et al., 2007).

No Brasil pesquisas clínicas com a miltefosine são recentes e ainda estão em andamento. Observa-se um crescente interesse dos pesquisadores em estudar essa droga.

Teixeira e colaboradores (2007) realizaram pesquisas *in vitro* para observar a ação da miltefosine em culturas de macrófagos peritonias de camundongos BALB/c infectados com

Leishmania (Leishmania) chagasi, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, concluindo que a droga foi ativa contra todas as espécies.

Sampaio e colaboradores foram pioneiros no estudo da miltefosine no Brasil. Iniciaram pesquisas experimentais *in vivo* em camundongos para avaliar a eficácia da miltefosine no tratamento da leishmaniose tegumentar americana causada principalmente pela *L. amazonensis* (SAMPAIO et al., 2005; SAMPAIO et al., 2007 (a)(b)). Também obtiveram resultados clínicos com o primeiro relato brasileiro de tratamento da forma mucosa de leishmaniose tegumentar americana refratária utilizando a miltefosine, com resultados surpreendentes de eficácia (ZANCANARO et al., 2007).

No presente estudo foi feita uma avaliação da ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine, N-metil glucamina e a associação das duas drogas em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*, que são as espécies causadoras de LTA mais comumente encontradas no Brasil. Baseando-se nos resultados *in vitro* favoráveis à miltefosine, foi também realizado um estudo comparativo *in vivo* entre a miltefosine usada isolada, a N-metil glucamina e a associação das duas drogas no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6 causada pela *L. amazonensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903) é constituído por protozoários de várias espécies que causam as leishmanioses, doenças infecto-parasitárias. As leishmânias são parasitos encontrados nas formas flageladas promastigotas (FIGURA 2) e paramastigotas no trato digestivo de hospedeiros invertebrados (insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos) e amastigota (FIGURA 3), sem flagelo livre, parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, que incluem uma grande variedade de mamíferos, entre estes, o homem (GRIMALDI-JR, 1982; TORO, 1983).



Figura 2 - Forma flagelada ou promastigota de *Leishmania sp.*

(Fonte: <http://www.ufrgs.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm>)

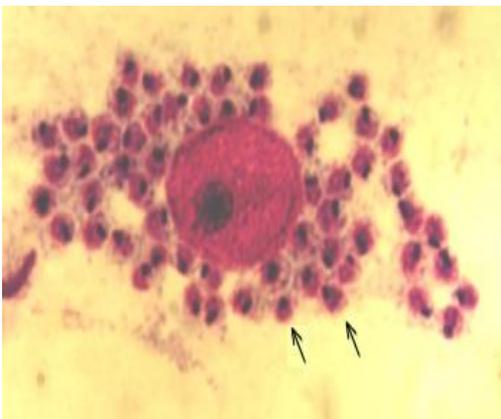


Figura 3 - Forma aflagelada ou amastigota de *Leishmania sp.*

(Fonte: <http://www.ufrgs.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm>)

Quando o homem é picado pela fêmea infectada do flebotomíneo, formas promastigotas metacíclicas regurgitadas penetram na pele lesada e causam a infecção por leishmânia. As promastigotas são então fagocitadas por macrófagos e dentro destes se diferenciam para formas amastigotas. Estas se multiplicam e conseguem inibir diversos mecanismos de defesa celular que deveriam causar sua lise, tais como fusão fagossomo-

endossomo, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e citocinas (CUNNINGHAM, 2002).

Atualmente, nas Américas, esse gênero é agrupado em dois subgêneros, de acordo com o local de adesão e multiplicação dos parasitos no tubo digestivo dos flebotomíneos: as espécies que se desenvolvem no intestino posterior pertencem ao subgênero *Viannia*, enquanto aquelas que se desenvolvem na porção média e anterior do tubo digestivo, pertencem ao subgênero *Leishmania* (CASTILHO et al., 2003).

No Brasil foram identificadas sete espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, como causadoras de LTA. Seis espécies pertencem ao subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg* e *L. shawi* e uma espécie pertence ao subgênero *Leishmania*: *L. amazonensis*. A figura 4 representa a distribuição dessas espécies no Brasil (VIANNA, 1911; LAINSON; SHAW, 1972; BARRET; SENRA, 1989).

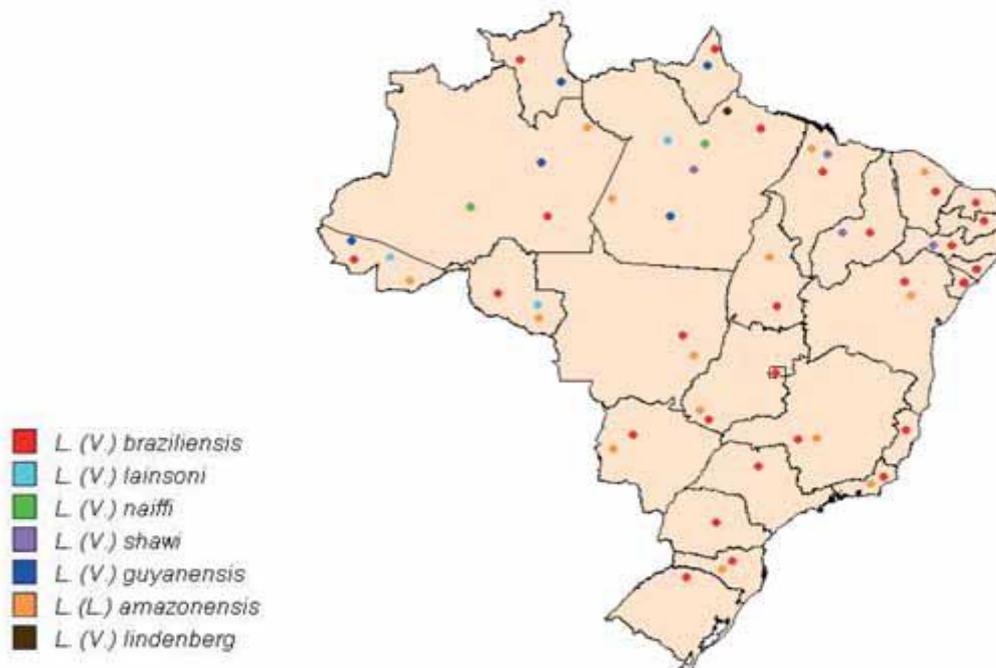


Figura 4 - Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da LTA, Brasil – 2005.

(Fonte: SVS/MS)

As três principais espécies mais diretamente envolvidas na LTA no Brasil são; *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

A *L. amazonensis* está distribuída pelas florestas da Amazônia, Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás) podendo causar as formas cutânea

e cutânea difusa, esta última ocorrendo em 1% dos casos, entretanto sem cura com os tratamentos preconizados. A *L. braziliensis* é encontrada em todas as regiões do país, do norte ao sul, podendo causar a forma mucosa que é grave e de difícil tratamento. A *L. guyanensis* aparentemente está limitada ao norte da bacia amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e Guiana, e causa, sobretudo, lesões cutâneas (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007).

As leishmanioses são zoonoses de animais silvestres e mais raramente de animais domésticos. A manutenção dos parasitos na natureza não se deve ao homem, pois esse é considerado um hospedeiro acidental. As diferentes manifestações das doenças são dependentes de fatores de virulência do próprio parasito, principalmente da espécie de leishmânia infectante, e da resposta imune estabelecida pelo hospedeiro (TORO, 1983; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A doença pode dividir-se em dois grandes grupos: o das leishmanioses dermatrópicas/mucotrópicas (tegumentares) e o das leishmanioses viscerotrópicas. O primeiro denomina-se assim porque afeta principalmente a estrutura da pele e, raramente, das mucosas das vias aéreas superiores, sendo reconhecidas clinicamente três apresentações: a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucosa (LM), e a leishmaniose cutânea-difusa (LCD), sendo todas elas usualmente denominadas de leishmaniose tegumentar americana (LTA). A leishmaniose viscerotrópica mais conhecida é a leishmaniose visceral (LV), forma mais grave, cujos principais achados clínicos e laboratoriais são: febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo levando à caquexia e, finalmente, ao óbito, se o paciente não for submetido ao tratamento específico (PEARSON; SOUSA, 1996).

Esse polimorfismo clínico das leishmanioses se deve principalmente ao parasito e isso é demonstrado em diversos estudos sobre a correlação entre determinados genótipos de espécies e cepas de *Leishmania* e manifestações clínicas da doença (REITHINGER et al., 2007).

Desde a antiguidade que a LTA acompanha o homem, pois relatos e descrições dessa doença são encontrados já a partir do século I d.C. Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentam mutilações de lábios e nariz, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutânea mucosa (BASANO; CAMARGO, 2004).

Altamirano-Enciso e colaboradores (2003) num estudo sobre a origem e dispersão das LC e LM, concluíram com base em fontes históricas pré e pós-colombianas, que o local de origem da LM parece ter sido a Amazônia entre os limites do Brasil com a Bolívia e o Peru. Sugeriram também que as migrações humanas desempenharam um papel importante na disseminação da LTA.

Vale ressaltar o aumento no número de casos na última década de co-infecção *Leishmania*/HIV, causando mudanças na epidemiologia, apresentação e clínica da leishmaniose. Esse fato é considerado uma ameaça emergente em diversos países, principalmente porque o comprometimento do sistema imune do paciente com HIV pode acarretar manifestações clínicas em pacientes antes assintomáticos, assim como a evolução de casos complexos e de difícil tratamento, como a forma cutânea disseminada ou a visceralização de espécies tipicamente dermatrópicas (DESJEUX; ALVAR, 2003; CRUZ et al., 2006).

Atualmente, as leishmanioses ocorrem de forma endêmica em vários países de quatro continentes. Mesmo sendo doenças de extrema importância para a saúde pública, apenas 30 países fazem a notificação compulsória dos casos. Aproximadamente 90% de todos os casos de LV registrados são provenientes de 05 países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão, enquanto que 90% dos casos de LTA ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. Considerando a LC, cerca de 90% dos casos anuais são provenientes do Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (DESJEUX; LEWIN, 1996; REITHINGER et al., 2007).

A LTA tem sua importância epidemiológica alicerçada nas incidências e nos diferentes quadros clínicos graves conhecidos, principalmente LM e LCD, cuja evolução determina mutilações severas ou permanentes. Milhares de pessoas no mundo, a cada ano, são atingidas por essa parasitose, com grave repercussão na saúde pública de diversos países (COSTA, 2005).

A doença ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, sendo que na média do país predominam os maiores de 10 anos (90% dos casos) e o sexo masculino (74%). Zonas rurais, favelas e regiões carentes de saneamento básico são as áreas mais propícias para a disseminação da doença. (GOMES, 1992; BASANO, 2004; BRASIL, 2007).

A partir da década de 1980 o Ministério da Saúde (MS) verificou um aumento no número de casos registrados de LTA, período em que se solidificaram as ações de vigilância e controle da doença no país. Entre 1985 e 2005, verificaram-se uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes. A figura 5 mostra os indicadores da densidade de casos de LTA (n.º de casos de

LTA por Km²) e os circuitos de produção da doença no Brasil, entre os anos de 2001 a 2004 (BRASIL, 2007).

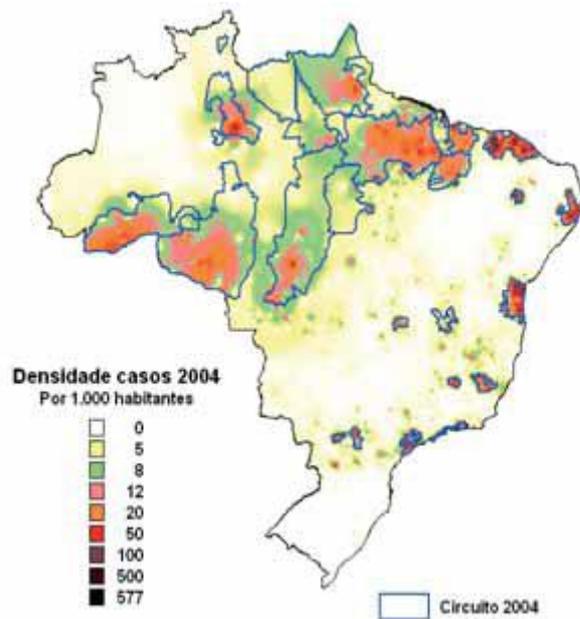


Figura 5 - Densidade de casos (2004) e circuitos de leishmaniose tegumentar americana por município, Brasil (2001 a 2003).

(Fonte: SVS e DESP/MS)

Costa (2005), estudando a epidemiologia das leishmanioses no Brasil, observou que a região Norte destaca-se com 34,9% do total de casos de LTA, com risco de doença de 92,3/100.000 habitantes (cinco vezes a média nacional). O Centro-Oeste corresponde a segunda maior área em risco, com uma média de 38,8/100.000 habitantes; seguida pela região Nordeste, com 30,8/100.000 habitantes, para o ano de 1995, contribuindo com o 2º maior número de casos do país (28%), porém com risco da população adoecer de 19,7/100.000 habitantes. As demais regiões (Sudeste e Sul) não desempenham papel preocupante quando se trata da distribuição dos casos. Porém, o mesmo autor ressalta que o perfil epidemiológico da doença tem sido modificado pela mudança ambiental resultante das atividades humanas, tanto nas áreas onde a transmissão é florestal, como nas áreas onde a transmissão é periurbana e peridomiciliar, com possível envolvimento de reservatórios domésticos.

No Distrito Federal (DF), foi constatada a presença de vetores e de pacientes infectados com o parasito. Ao que tudo indica casos autóctones, pois os pacientes residentes no DF relataram não ter saído da sua área por um tempo que variou de 06 meses a 02 anos antes do início da doença. Foi observado predomínio de pacientes do sexo masculino,

lavradores, na faixa etária entre 20 e 39 anos, com a forma cutânea da leishmaniose (SAMPAIO; DE PAULA, 1999; NAME et al., 2005).

O controle da LTA traz perspectivas complexas, envolvendo educação, informação, promoção de saúde, conhecimento de casos suspeitos, diagnóstico e tratamento precoces, identificação do agente etiológico, conhecimento das áreas de transmissão, redução do contato homem-vetor, devendo ser específico conforme a situação epidemiológica de cada região (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Quanto ao diagnóstico da LTA, aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais devem ser observados simultaneamente, pois frequentemente a associação de alguns desses elementos se faz necessária para que se chegue ao diagnóstico final.

Os exames laboratoriais podem ser divididos em técnicas de detecção do parasito (pesquisa direta, isolamento em cultura, inoculação em animais, exame histopatológico e reação em cadeia da polimerase - PCR) e técnicas de imunodiagnósticos como detecção da resposta imune celular, detecção de anticorpos e detecção do antígeno em imunocomplexos (DEDET, 1999; SALMAN et al., 1999; MEDEIROS; ROSELINO, 1999; CASTILHO et al., 2003).

A demonstração do parasito em amostras de tecido corado e a cultura *in vitro* em meios específicos são considerados os principais métodos diagnósticos da leishmaniose (WEIGLE et al., 2002).

Vale ressaltar que o exame histopatológico que mostra desde infiltrado celular do tipo linfocitoplasmocitário até a formação de granulomas com ou sem necrose, comumente deixa a desejar no achado de parasitos, com incidência de apenas 38% (MAGALHÃES et al., 1986).

Técnicas de diagnóstico baseadas em reações imunológicas, tais como a imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoadsorvente enzima-associado (ELISA), fixação de complemento (FC) e a aglutinação direta vêm sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas. Porém, todas estas técnicas não são usadas no diagnóstico rotineiro da doença em questão, porque a positividade demonstrada nos testes depende de fatores como o tempo e a forma da doença, além da instituição de terapia medicamentosa (BERMAN, 1997). Deve-se considerar também a questão do custo elevado quando comparado a outras técnicas.

Na prática, o diagnóstico utilizado para a LTA baseia-se, principalmente, nas manifestações clínicas apresentadas pelo paciente, nos fatores epidemiológicos e no teste de Montenegro.

Montenegro (1926) introduziu na prática médica um teste realizado por intermédio da injeção intradérmica de uma suspensão de promastigotas mortas de *L. braziliensis*. Ainda hoje o teste de Montenegro ou Intradermorreação de Montenegro (IDRM) que provoca uma reação cutânea de hipersensibilidade retardada, é considerado o exame complementar mais importante no diagnóstico da LTA por sua grande especificidade e sensibilidade, apresentando-se positivo entre 86,4 e 97,5% dos casos de LTA (MARZOCHI et al., 1980).

Quanto ao tratamento da LTA, a primeira droga realmente eficaz utilizada foi o tártaro emético, que foi descoberta pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912. Essa droga é um antimônio trivalente, que foi substituída posteriormente pelos antimoniais pentavalentes com o intuito de diminuir os efeitos tóxicos e colaterais graves que causava (VIANNA, 1912; FURTADO, 1974).

Como já citado anteriormente, no Brasil se utiliza principalmente a NMG, que é um antimônio pentavalente (FIGURA 6) surgido durante a Segunda Guerra Mundial, na França, vindo como uma alternativa ao até então utilizado gluconato de antimônio (V) sódico.

A NMG é indicada para todas as formas de LTA, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas (RATH et al, 2003).

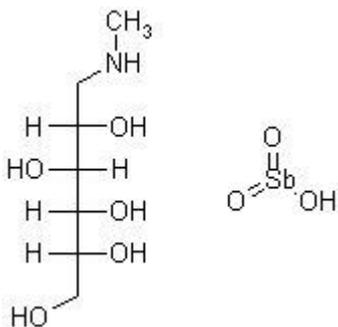


Figura 6 - Fórmula estrutural da N-metil glucamina.

(Fonte: <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/cutaneous.htm>)

A OMS recomenda que a dose deste antimônio seja calculada em mg Sb⁺⁵/kg/dia. Na forma cutânea localizada e disseminada, a dose recomendada varia entre 10 e 20mg Sb⁺⁵/kg/dia durante 20 dias seguidos. Na forma mucosa a dose recomendada é de 20mg Sb⁺⁵/kg/dia, durante 30 dias seguidos, preferencialmente em ambiente hospitalar (BRASIL, 2007).

O mecanismo de ação dos antimoniais é pouco conhecido, mas admite-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração e que assim possa interferir no processo de beta-oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (ROBERTS et al., 1998; RATH et al., 2003).

Miekeley e colaboradores (2002) verificaram que, após administração intramuscular de NMG em pacientes com leishmaniose, ocorreu conversão *in vivo* do composto orgânico estibiado para as formas iônicas Sb^{3+} e Sb^{5+} .

A anfotericina B e a pentamidina são alternativas terapêuticas de segunda escolha para o tratamento da LTA.

A pentamidina, após falha de um tratamento com o uso do antimonial, tem se mostrado uma boa opção, com resultados melhores que o retratamento com o antimonial (ALMEIDA et al., 2007; TUON et al., 2007). Essa droga (FIGURA 7) é um antiprotozoário efetivo no tratamento das leishmanioses. Do seu mecanismo de ação sabe-se que interfere com o transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucleicos e podem ligar-se ao DNA do cinetoplasto do parasito (SANDS et al., 1985).

No Brasil é comercializado apenas o isotionato de pentamidina. Para o tratamento da LTA a dose preconizada é de 4,0 mg/kg/dia, por via intramuscular profunda, de 02 em 02 dias, não devendo ultrapassar a dose total de 2,0g (SANDS et al., 1985; BRASIL, 2007).

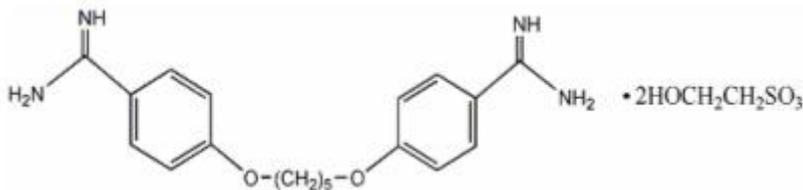


Figura 7 - Fórmula estrutural da pentamidina

(Fonte: <http://www.hfchem.cn/template/Pentamidine-Isethionate.htm>)

Os efeitos colaterais mais comumente observados com a pentamidina são: hipotensão, náuseas, vômitos, síncope, hipoglicemia, alterações renais e efeito diabetogênico em fase mais tardia (JHA, 1983; OSEI et al, 1984).

Paula e colaboradores (2003) realizaram um estudo comparativo de eficácia entre o isotionato de pentamidina e a N-metil-glucamina no tratamento da forma cutânea da LTA em

pacientes do Hospital Universitário de Brasília e concluíram que as duas drogas, nos esquemas terapêuticos propostos, tiveram eficácia semelhante.

A pentamidina também tem se mostrado eficaz para o tratamento e cicatrização das lesões de LM (SAMPAIO et al, 1988; AMATO, 1997).

Já a anfotericina B (FIGURA 8) é um antibiótico polieno que atua no ergosterol da membrana celular, alterando sua permeabilidade e causando morte celular. É uma droga efetiva na LC, LM e LCD e tem sido empregada com sucesso em pacientes refratários ao antimonial pentavalente. Porém seu uso é limitado pelos efeitos adversos como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia em um terço dos doentes (SAMPAIO; MARSDEN, 1997; AMATO et al., 2000; MOTTA, 2006).

As quatro apresentações da droga disponíveis no mercado são; anfotericina B, anfotericina B lipossomal, anfotericina B em dispersão coloidal e anfotericina B em complexo lipídico (LIMA; SOUZA, 2005; FILIPPIN; SOUZA, 2006).

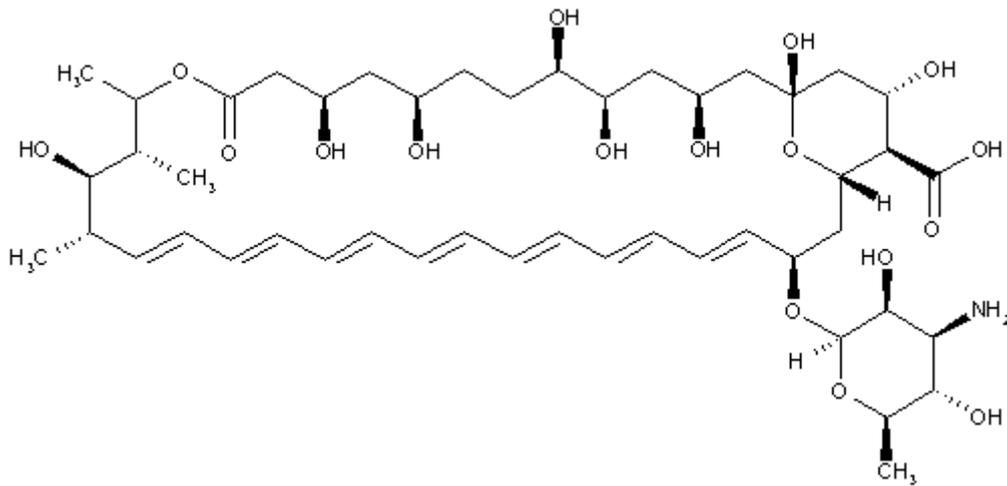


Figura 8 - Fórmula estrutural da anfotericina B

(Fonte: <http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioAntibioticos2.htm>)

A anfotericina B em lipossoma é incorporada pelo macrófago se abrigando no parasito e assim praticamente não reage com o colesterol das células do hospedeiro, aumentando a eficácia e tolerabilidade da droga (SOLOMON et al., 2007, ROBERTS, 2003). A anfotericina B em dispersão coloidal tem se mostrado uma droga útil no tratamento da LM, principalmente nos casos de complicações aos tratamentos de primeira linha ou recorrência da doença. Febre e calafrios se apresentaram como os efeitos colaterais mais comuns (DIETZE et al., 1993; AMATO et al., 2007).

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas sobre uma vacina antileishmaniose tegumentar americana para fins profiláticos e terapêuticos, porém os resultados têm sido controversos. Por exemplo, num ensaio clínico randomizado, Hueb e colaboradores (2007) concluíram que a taxa de cura obtida pela vacina (*Leishvacin*[®]) foi inferior à observada em outros estudos enquanto que a cura obtida com o antimonial mostrou-se igual ou acima do esperado. Já em outro estudo, Mayrink e colaboradores (2006) concluíram que a associação da vacina com o antimônio apresentou o mesmo índice de cura em relação ao tratamento padrão (100%), e ainda reduziu o volume do sal em 17,9% e o tempo de cura significativamente, de 87 para 62 dias; conseqüentemente, reduzindo os efeitos colaterais.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL:

Avaliar *in vitro* a ação leishmanicida da miltefosine em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* e comparar *in vivo* sua eficácia com a da N-metil glucamina e também com a associação das duas drogas no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental.

3.2 ESPECÍFICOS:

Avaliar *in vitro* a ação leishmanicida da miltefosine em promastigotas de *L.(L) amazonensis*;
Avaliar *in vitro* a ação leishmanicida da miltefosine em promastigotas de *L.(V) guyanensis*;
Avaliar *in vitro* a ação leishmanicida da miltefosine em promastigotas de *L.(V) braziliensis*;
Comparar *in vitro* a ação leishmanicida da miltefosine entre as espécies *L.(L) amazonensis*, *L.(V) guyanensis* e *L.(V) braziliensis*;
Estudar *in vivo* a eficácia da miltefosine no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental em camundongos C57BL/6 causada por *L. amazonensis* comparando com a N-metil glucamina;
Estudar *in vivo* a eficácia da miltefosine em associação com a N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental em camundongos C57BL/6 causada por *L. amazonensis*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipos de estudo:

Estudo experimental *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Origens das cepas de *Leishmania*:

Os parasitos utilizados no presente trabalho foram formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/94/M15176) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/M4147/2007) oriundas de culturas de cepas mantidas crio-preservadas no laboratório de Dermatômico da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Vale salientar que essas cepas são inoculadas, a cada três meses, em *hamsters* para assegurar a infectividade e garantir a virulência dos inóculos.

A cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foi cedida pelo Instituto Evandro Chagas, Belém-Pará e identificada por técnicas de anticorpos monoclonais e PCR.

A cepa de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi identificada pela técnica de isoenzimas e anticorpos monoclonais, oriunda da OMS.

A cepa de *Leishmania (Viannia) guyanensis* identificada por anticorpos monoclonais e isoenzimas foi gentilmente cedida pelo Instituto Evandro Chagas de Belém-PA através da Dra. Edna Ishikawa.

4.3 Determinação das curvas padrão de crescimento:

A avaliação do desenvolvimento e multiplicação das formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foi realizada através de curvas de crescimento estabelecida pela metodologia descrita por Brener (1961) adaptada para microscópio binocular. Essa curva consiste na quantificação de formas promastigotas, realizada em câmara hemacitométrica de Neubauer.

Foram realizadas curvas básicas, a partir do inóculo de 10^7 promastigotas/mL de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* no meio de cultura líquido Schneider (Sigma[®]) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 0,2% de gentamicina, distribuídos em garrafas para cultivo de 60 ml (área de crescimento 25 cm²).

Para a realização da contagem, as promastigotas foram suspensas em uma diluição contendo 10 μL do meio de cultura, com os parasitos em fase logarítmica de crescimento, e 90 μL de tampão fosfato salino (PBS). Depois a suspensão foi homogeneizada e aproximadamente 10 μL da mesma foi colocada na câmara de Neubauer até seu preenchimento. A parte da câmara utilizada para a contagem dos parasitos foi a mesma utilizada na contagem de leucócitos (FIGURA 9). Na contagem, rosetas ou emaranhados não foram incluídos. As formas em divisão inicial são contadas como um e em divisão avançada como dois. Dois quadrantes opostos foram contados e calculados a média (URDAPILLETA, 2006).

O número de parasitos de cada espécie foi quantificado em intervalos de 24 horas por sete dias consecutivos, e a contagem quase sempre foi realizada no mesmo horário. O experimento foi realizado em triplicata.

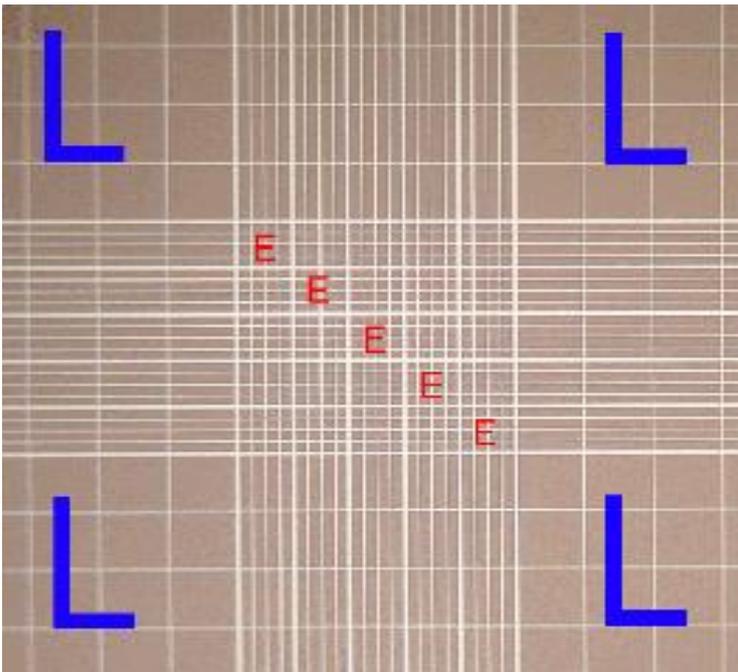


Figura 9 – Câmara de contagem adaptada para microscópio de campo claro ou de contraste de fases. A área de contagem das formas promastigotas é a marcada com L.

(Fonte: <http://www.ufrgs.br/hcv/lacvet/leucocitos.htm>)

As análises estatísticas foram efetuadas no programa SPSS[®] versão 13.0. A diferença entre as médias do número de promastigotas/dia foi analisada pelo teste de análise de variância (ANOVA), para cada espécie de *Leishmania*. Para as comparações múltiplas entre

as três espécies, posterior a ANOVA, foi escolhido o teste de Tukey, pois as variâncias foram assumidas iguais ($p > 0,05$; teste de Levene).

4.4 Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine sobre as formas promastigotas de *Leishmania*:

Formas promastigotas em fase metacíclica (definidas pela curva de crescimento) de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram semeadas em placas tipo ELISA fundo chato com 96 poços (FIGURA 10) em concentrações de $6,2 \times 10^7$, $8,0 \times 10^7$ e $3,0 \times 10^7$ parasitos/mL, respectivamente, em meio de cultura líquida Schneider (Sigma®) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 0,2% de gentamicina e incubadas por 48 horas em estufa incubadora tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) a 26° C na presença de diferentes concentrações decrescentes de miltefosine (100 a 3,1 µg/mL), de N-metil glucamina (300 a 9,3 µg/mL) e da associação das duas drogas, nas mesmas concentrações anteriores. Foram feitas uma placa para cada espécie de *Leishmania* e as diluições foram realizadas em quadruplicata.

A atividade leishmanicida das drogas foi avaliada através do método colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT).

Após o período de incubação das promastigotas com as drogas, 15 µl de uma solução de MTT (5mg/ml) foi adicionada a cada poço. A placa foi então incubada a 26°C por 4 horas no escuro. Após esse período 60 µl de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 10% foram adicionados em cada poço, a fim de solubilizar os cristais de formazan, e as placas foram mantidas na estufa por 12 horas. A absorvância correspondente a cada amostra foi então medida no leitor de ELISA a 570 nm. A absorvância obtida pelas células controle, não tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular. (ALTMAN, 1974; MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

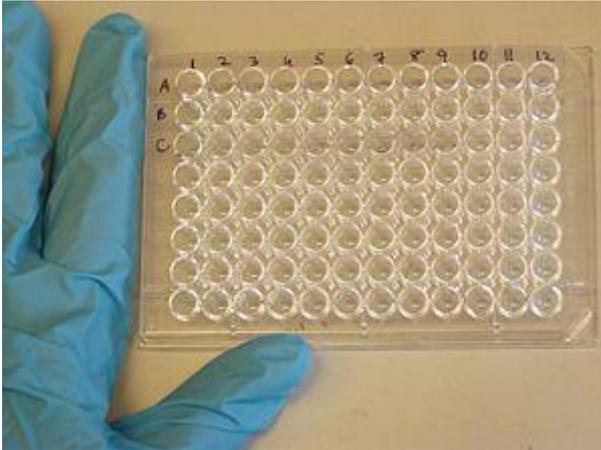


Figura 10 – placa tipo ELISA fundo chato com 96 poços

(Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/ELISA>)

As análises estatísticas foram efetuadas no programa SPSS[®] versão 13.0. Para as análises de viabilidade celular das espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, foi utilizado o teste H de Kruskal-Wallis (pois a pressuposição da ANOVA não foi encontrada, ou seja, para o teste de normalidade de Shapiro-Wilk calculou-se $p < 0,05$). O teste para comparações múltiplas a posterior foi o de Bonferroni. Já no caso da espécie *L. guyanensis* a análise da viabilidade foi feita via ANOVA, com o *post hoc* de Tukey (as variâncias foram assumidas iguais). Os valores de IC₅₀ foram estimados a partir dos valores médios por interpolação gráfica utilizando o programa Graph Prism Instat 03.

4.5 Estudo comparativo entre a miltefosine, N-metil glucamina e a associação da miltefosine com N-metil glucamina no tratamento de leishmaniose cutânea experimental:

Foram utilizados 80 camundongos isogênicos, cepa C57BL/6, fêmeas, adultas, com peso individual de aproximadamente 30g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (Brasília-DF), mantidos em ambiente controlado com água e ração oferecidos à vontade durante todo experimento. Os camundongos foram infectados no coxim plantar direito com $4,5 \times 10^7$ promastigotas de *L. amazonensis* em fase metacíclica.

Duas semanas depois da inoculação, para confirmar a infecção, foram feitas culturas e esfregaços de secreções contendo linfas das patas inoculadas. Para essa confirmação utilizaram-se três camundongos de cada grupo, resultando num total de 12 culturas e 12 esfregaços.

O tratamento foi então iniciado, sendo os animais distribuídos nos seguintes grupos:

- a) Grupo miltefosine (M): grupo de 20 camundongos tratados com miltefosine na dose de 20mg/Kg/dia via oral, durante 10 dias;
- b) Grupo N-metil glucamina (G): grupo de 20 camundongos tratado com N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias;
- c) Grupo miltefosine + N-metil glucamina (M+G): grupo de 20 camundongos tratados com a associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens e vias de administrações anteriores, durante 10 dias;
- d) Grupo controle (C): grupo de 20 camundongos sem tratamento.

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (ANEXO A).

4.5.1 Avaliação da eficácia dos tratamentos:

4.5.1.1 Medição da lesão cutânea (diâmetro das patas):

O diâmetro da pata inoculada dos camundongos foi medida através de um paquímetro (FIGURA 11), com precisão de décimos de milímetro, imediatamente antes do tratamento e quatro dias após o seu término. Depois foi realizada a comparação dos diâmetros de cada um dos grupos após o tratamento com os valores encontrados pré-tratamento e entre os grupos tratados entre si.



Figura 11 - Paquímetro

(Fonte: Laboratório de Dermatocologia da UnB)

As análises estatísticas foram efetuadas no programa SPSS[®] versão 13.0.

Para comparar as médias dos diâmetros das patas para cada grupo confrontando as situações de pré e pós-tratamento, utilizaram-se o teste T pareado quando os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (teste de Levene) apresentavam, simultaneamente, $p < 0,05$; no caso contrário, o teste de escolha foi o teste T de Wilcoxon.

Nas comparações dos diferentes grupos entre si, para a situação pré e pós-tratamento, o teste de análise foi o teste H de Kruskal-Wallis (pois as pressuposições da ANOVA não foram encontradas) com *post hoc* de Bonferroni.

4.5.1.2 Exames parasitológicos:

4.5.1.2.1 Culturas e esfregaços:

Quatro dias após o término do tratamento foram extraídas amostras, por punção, das patas inoculadas para a realização de culturas tradicionais (suspensas no meio bifásico Novy-McNeal-Nicolle-NNN) e pesquisa de amastigotas em esfregaços corados pela coloração de Giemsa. As análises foram efetuadas no programa SPSS[®] versão 13.0. Os diferentes grupos foram comparados pelo teste do χ^2 .

4.5.1.2.2 Diluição limitante:

As patas (coxim plantar direito) de dois camundongos diferentes por grupo de tratamento foram submetidas à dissecação asséptica. Depois as mesmas foram trituradas em meio de cultura líquida Schneider (Sigma[®]) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 0,2% de gentamicina. Posteriormente esse material foi cultivado em placas tipo ELISA em sucessivas diluições de 10 vezes e incubado por até 72 horas em estufa tipo BOD a 26° C. Caso houvesse uma amastigota em cada poço, cresceriam formas promastigotas após o período de incubação e a leitura para observar a presença (+) ou ausência (-) dessas formas em cada poço era feita em microscópio de luz invertida com objetiva de aumento 40 vezes. O número de parasitos por pata foi analisado através do programa ELIDA[®] (TITUS et al., 1985; TASWELL, 1987).

5 RESULTADOS

5.1 Determinação das curvas padrão de crescimento:

Nas curvas realizadas (em triplicata) as promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram fase logarítmica de crescimento até o sexto dia e a partir deste iniciou-se a fase estacionária (GRÁFICO 1). Escolheu-se o sexto dia de crescimento como o dia padrão de uso da cepa, tanto para os estudos *in vitro*, quanto para os estudos *in vivo* realizados posteriormente.

No caso das promastigotas de *L. braziliensis* observou-se que a fase logarítmica de crescimento foi até o quinto dia e a partir deste iniciou-se a fase estacionária (GRÁFICO 2). Nos testes *in vitro* escolheu-se o quinto dia como o padrão para utilização dessa cepa nos futuros experimentos.

Finalmente, as promastigotas de *L. guyanensis* apresentaram fase logarítmica de crescimento até o sexto dia e a partir deste iniciou-se a fase estacionária (GRÁFICO 3). Nos testes *in vitro* o sexto dia foi escolhido como o padrão para essa espécie.

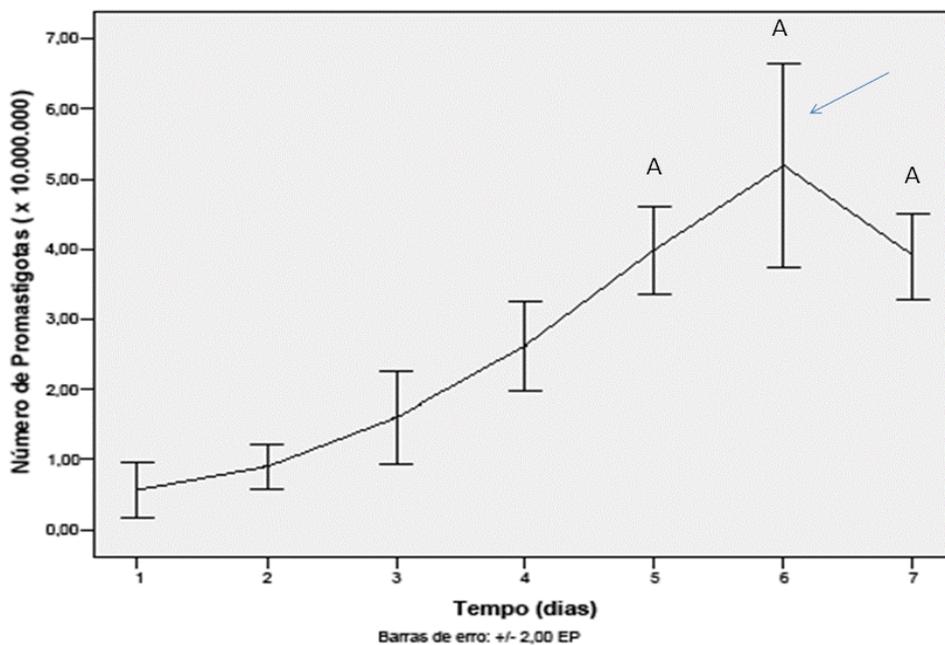


Gráfico 1- Distribuição das médias do número de promastigotas/mL de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* contadas segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). As barras representam duas vezes o erro padrão. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os dias. A seta indica o dia escolhido para realização dos experimentos.

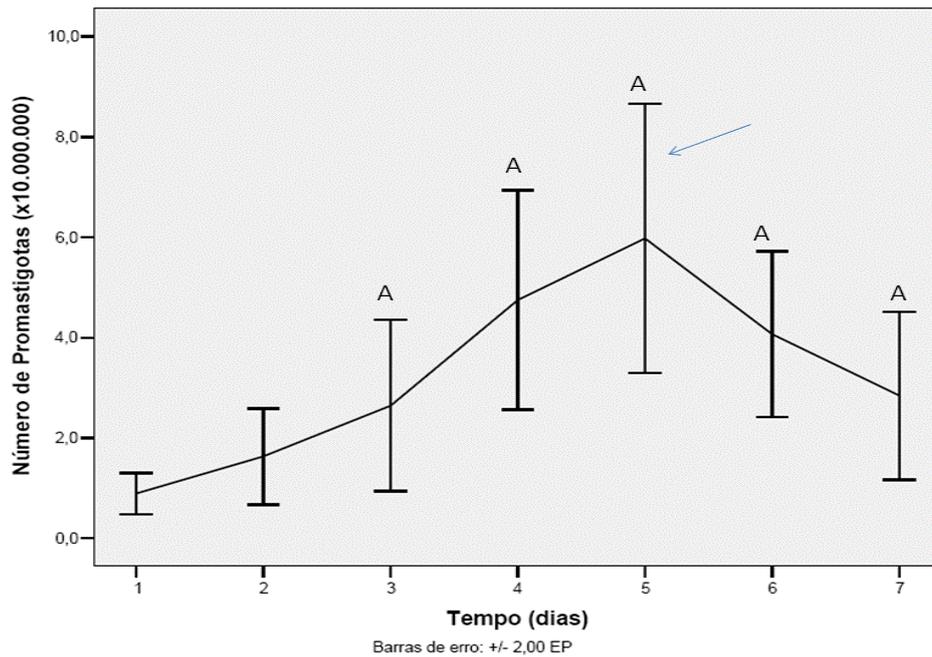


Gráfico 2- Distribuição das médias do número de promastigotas/mL de *Leishmania (Viannia) braziliensis* contadas segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). As barras representam duas vezes o erro padrão. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os dias. A seta indica o dia escolhido para realização dos experimentos.

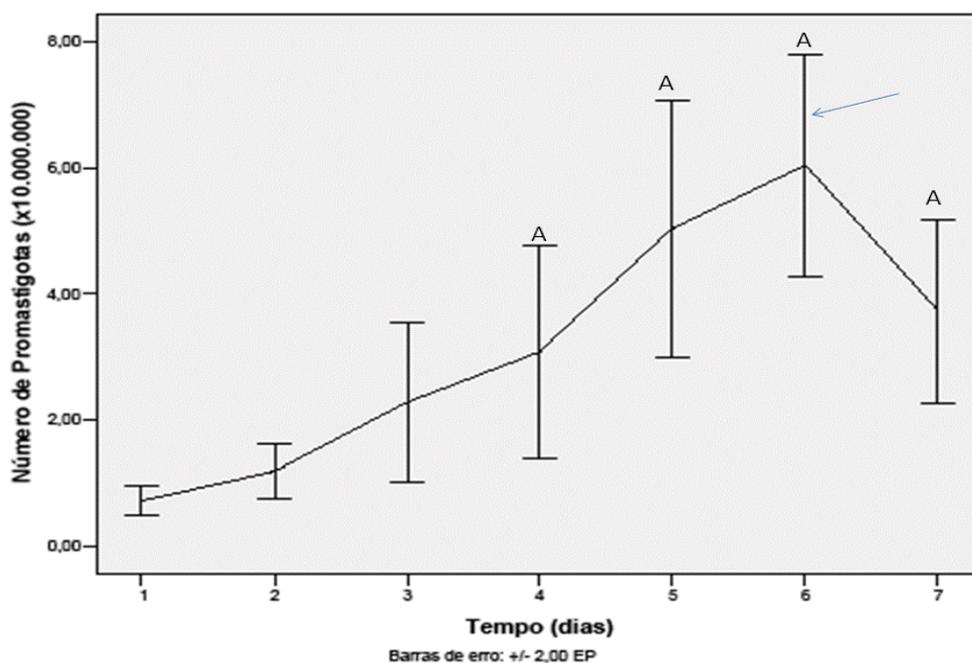


Gráfico 3- Distribuição das médias do número de promastigotas/mL de *Leishmania (Viannia) guyanensis* contadas segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). As barras representam duas vezes o erro padrão. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os dias. A seta indica o dia escolhido para realização dos experimentos.

5.2 Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine sobre as formas promastigotas de *Leishmania*:

A miltefosine (M) e a N-metil glucamina (G) foram avaliadas quanto as suas atividades leishmanicidas contra promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* através do cálculo do IC₅₀ (TABELA 1).

Tabela 1: Atividade leishmanicida *in vitro* da miltefosine e N-metil glucamina contra formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*

	Miltefosine	N-metil glucamina
Promastigotas	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	12,2 (0,6-216,5)	300 (120,3-400,3)
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	22,9 (9,7-53,9)	122,3 (87,5-150,9)
<i>Leishmania (L.) guyanensis</i>	271,7 (111,8-660,6)	3.919 (360,2-4.263)

Os resultados representam a média de experimentos realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%.

Contra as promastigotas de *L. amazonensis* a avaliação da atividade leishmanicida de M pelo MTT demonstrou valor de IC₅₀ igual a 12,2 µg/ml (GRÁFICO 5).

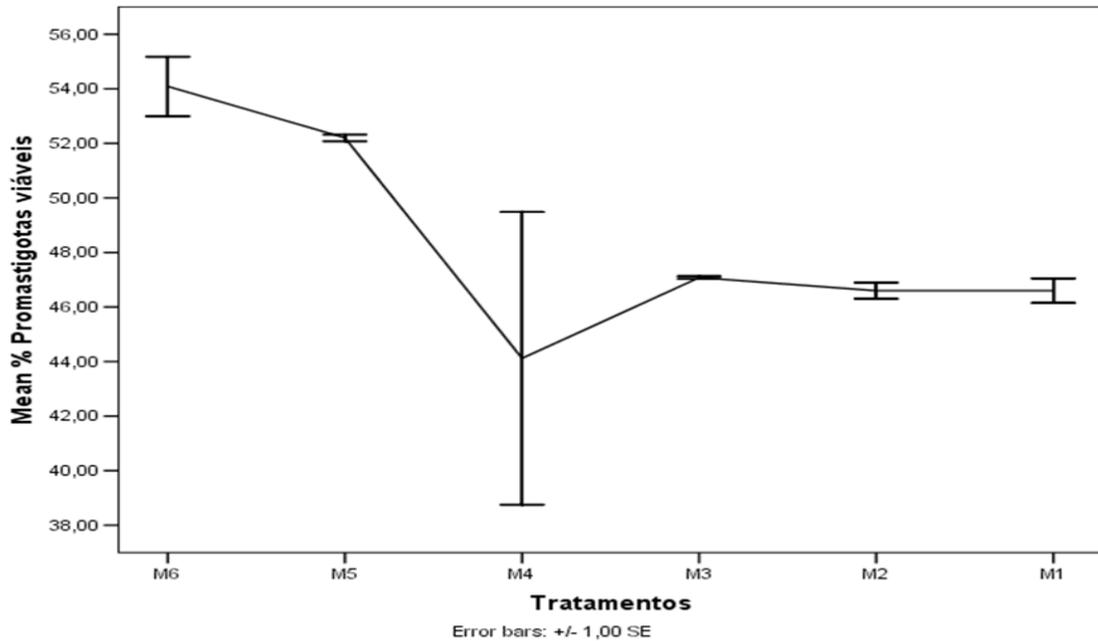


Gráfico 5 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (100 a 3,1 µg/mL) de miltefosine (M). As barras indicam o erro padrão da média. M1= 100 µg/mL; M2= 50 µg/mL; M3=25 µg/mL; M4= 12,5 µg/mL; M5=6,7 µg/mL; M6=3,1 µg/mL.

Contra as promastigotas de *L. amazonensis* a avaliação da atividade leishmanicida de G pelo MTT demonstrou valor de IC₅₀ a igual a 300 µg/ml (GRÁFICO 6).

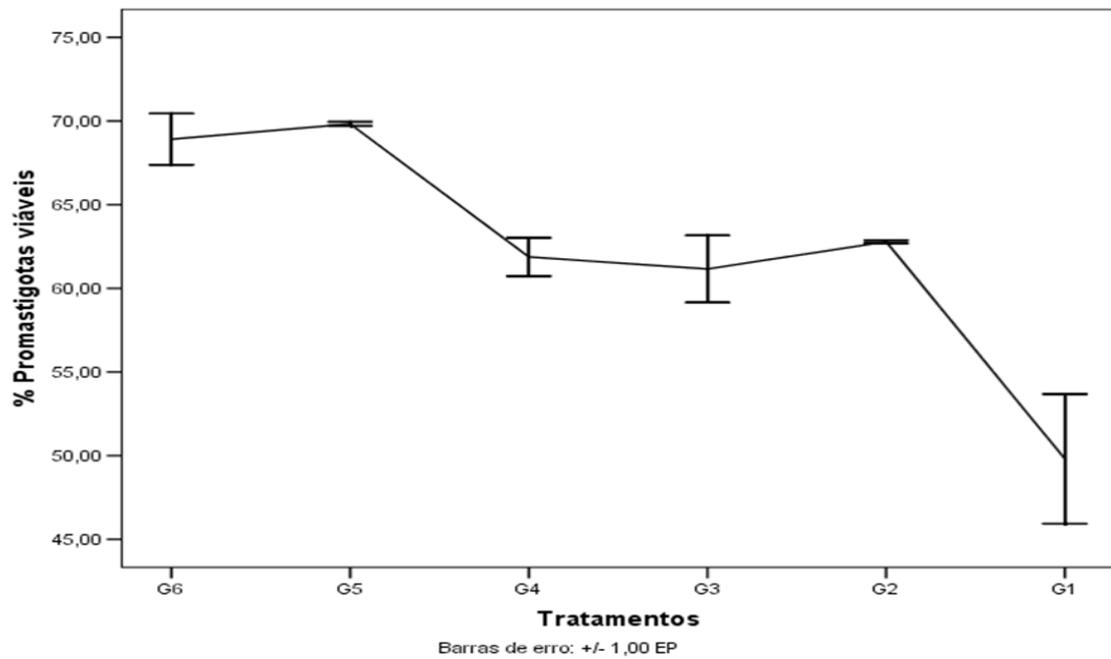


Gráfico 6 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (300 a 9,3 µg/mL) de N-metil glucamina (G). As barras indicam o erro padrão da média. G1=300 µg/mL; G2=150 µg/mL; G3=75 µg/mL; G4=37,5 µg/mL; G5=18,7 µg/mL; G6= 9,3 µg/mL.

No grupo M+G as concentrações 12,5+37,5 μ g/mL foram as que mais diminuíram a viabilidade celular das promastigotas de *L. amazonensis* (GRÁFICO 7).

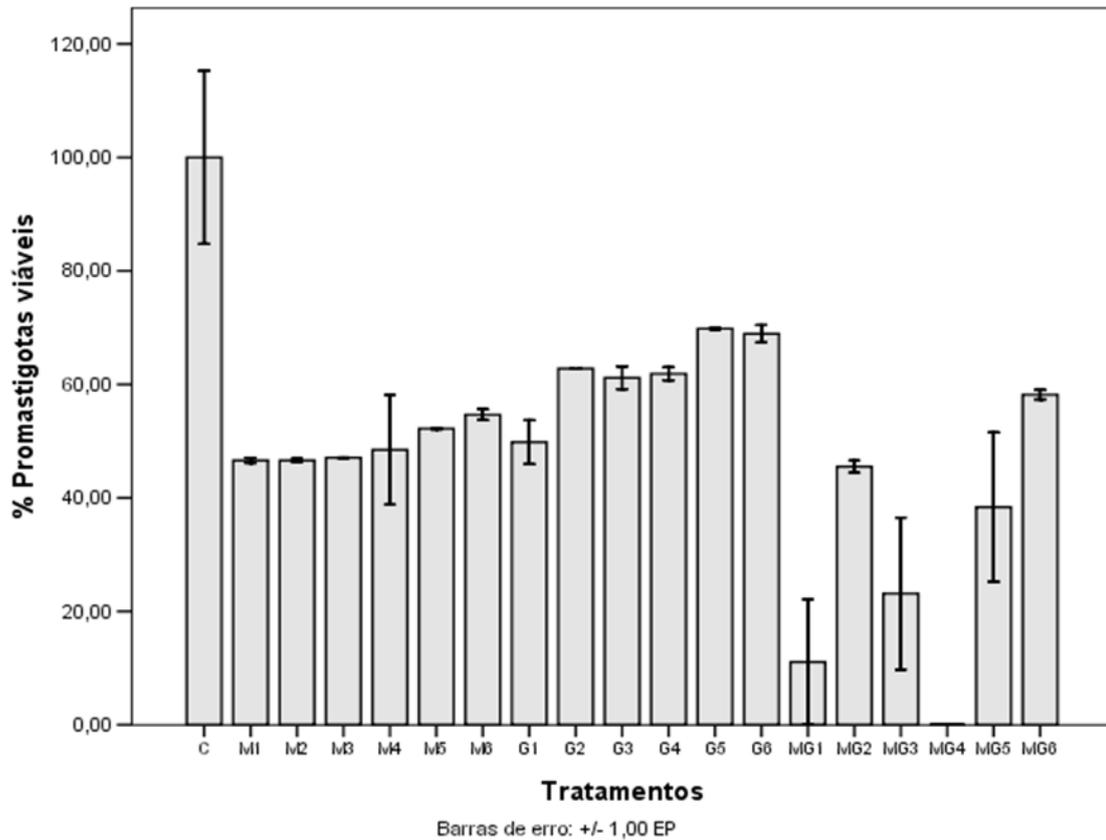


Gráfico 7 - Distribuição da viabilidade celular de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações de miltefosine (M), N-metil glucamina (G) e M+G. As barras indicam o erro padrão da média. MG1=100+300 μ g/mL; MG2=50+150 μ g/mL; MG3=25+75 μ g/mL; MG4=12,5+37,5 μ g/mL; MG5=6,7+18,7 μ g/mL; MG6=3,1+9,3 μ g/mL.

Contra as promastigotas de *L. braziliensis* a avaliação da atividade leishmanicida de M pelo MTT demonstrou valor de IC₅₀ igual a 22,9 µg/ml (GRÁFICO 8).

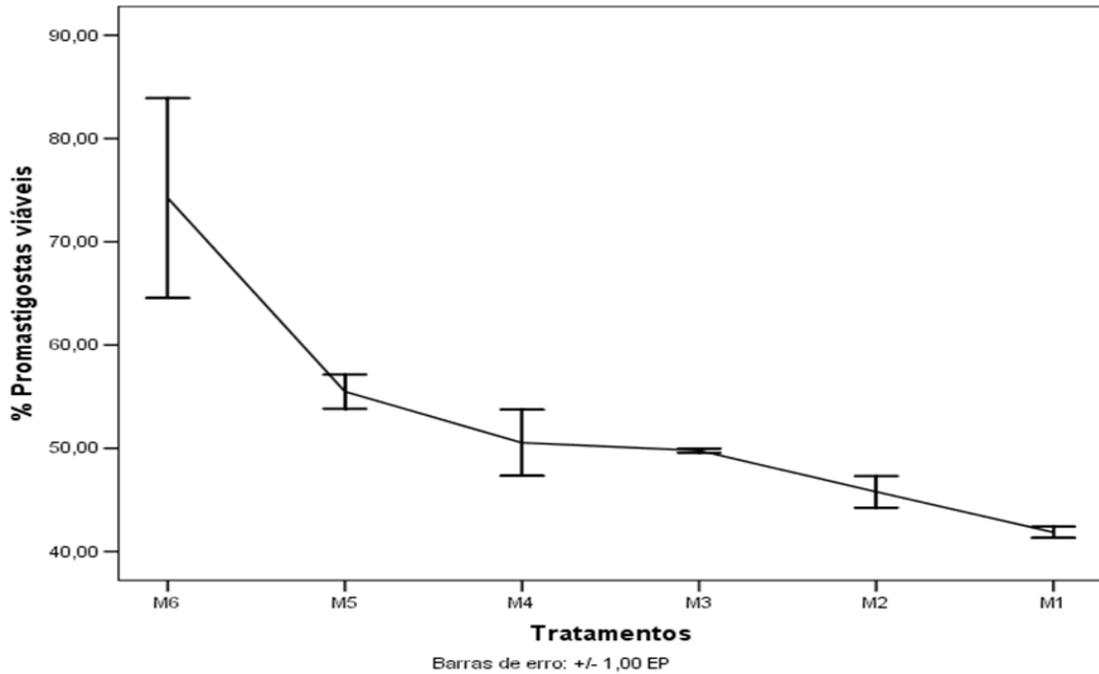


Gráfico 8 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) braziliensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (100 a 3,1 µg/mL) de miltefosine (M). As barras indicam o erro padrão da média. M1=100 µg/mL; M2=50 µg/mL; M3=25 µg/mL; M4=12,5 µg/mL; M5=6,7 µg/mL; M6= 3,1 µg/mL.

A G demonstrou valor de IC_{50} igual a $122,3 \mu\text{g/ml}$ contra as promastigotas de *L. braziliensis* (GRÁFICO 9).

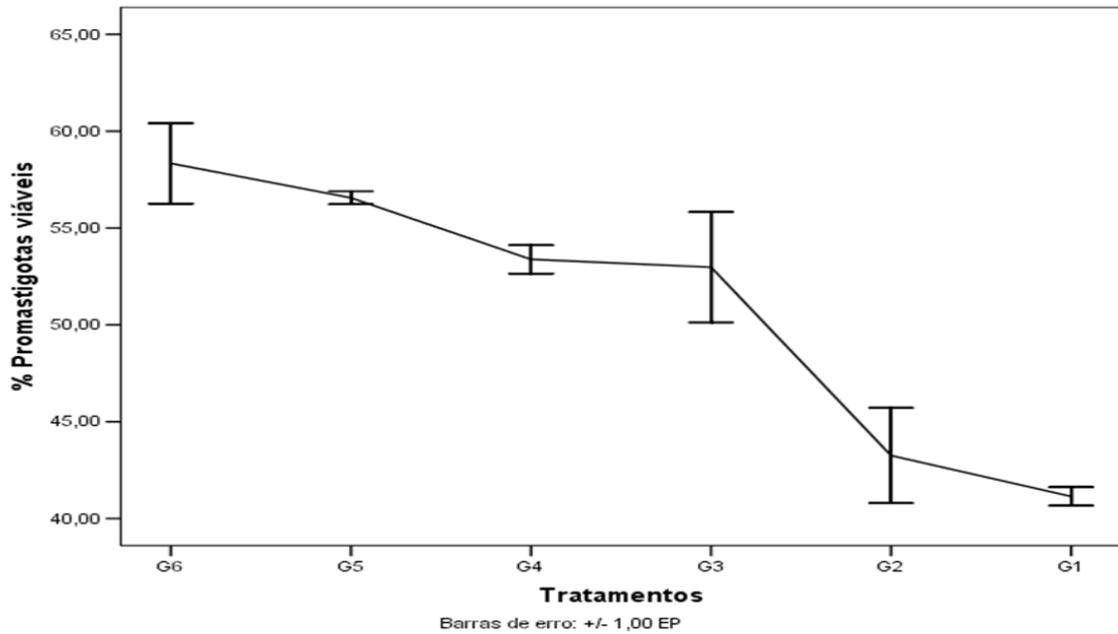


Gráfico 9 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) braziliensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (300 a $9,3 \mu\text{g/mL}$) de N-metil glucamina (G). As barras indicam o erro padrão da média. G1= $300 \mu\text{g/mL}$; G2= $150 \mu\text{g/mL}$; G3= $75 \mu\text{g/mL}$; G4= $37,5 \mu\text{g/mL}$; G5= $18,7 \mu\text{g/mL}$; G6= $9,3 \mu\text{g/mL}$.

No grupo M+G as concentrações 100+300 $\mu\text{g/mL}$ foram as que mais diminuíram a viabilidade celular das promastigotas de *L. braziliensis* (GRÁFICO 10).

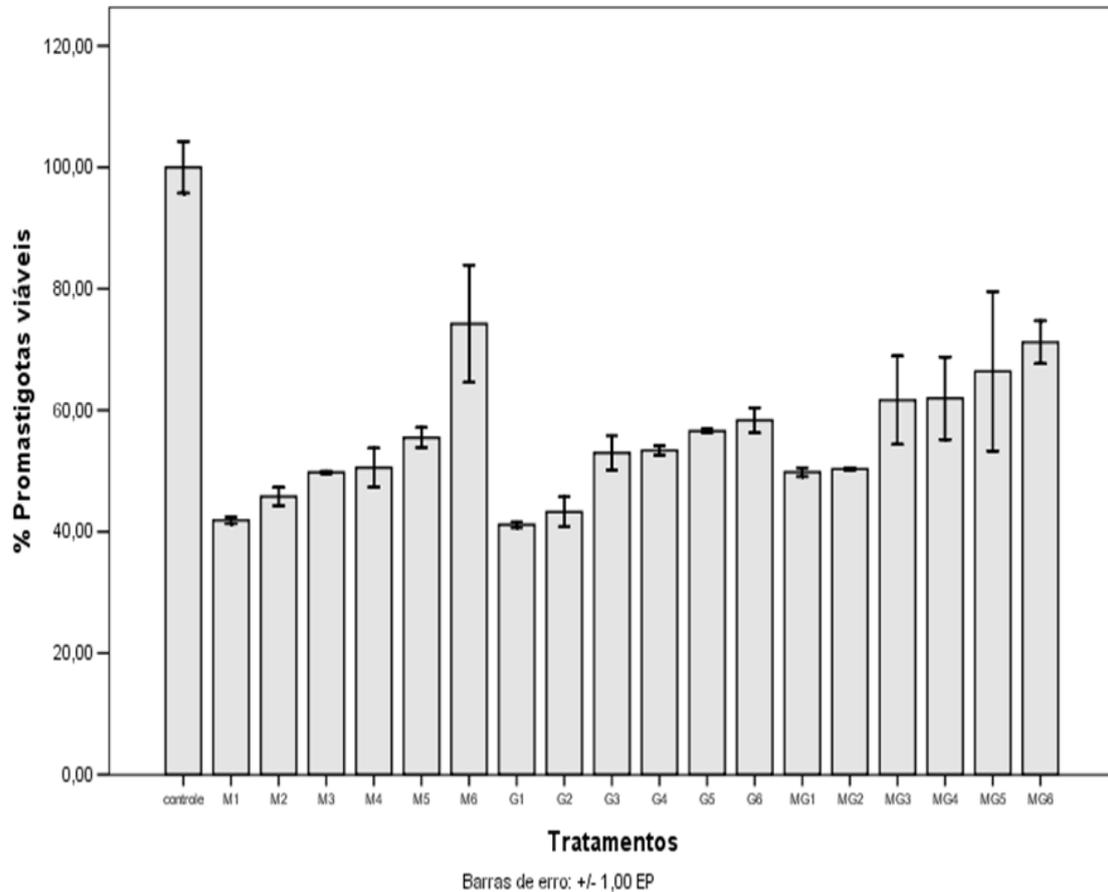


Gráfico 10 - Distribuição da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) braziliensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações de miltefosine (M), N-metil glucamina (G) e M+G. As barras indicam o erro padrão da média. MG1=100+300 $\mu\text{g/mL}$; MG2=50+150 $\mu\text{g/mL}$; MG3=25+75 $\mu\text{g/mL}$; MG4=12,5+37,5 $\mu\text{g/mL}$; MG5=6,7+18,7 $\mu\text{g/mL}$; MG6=3,1+9,3 $\mu\text{g/mL}$.

No caso das promastigotas de *L. guyanensis* a atividade leishmanicida da miltefosine pelo MTT demonstrou valor de IC_{50} igual a 271,7 $\mu\text{g/ml}$ (GR'AFICO 11).

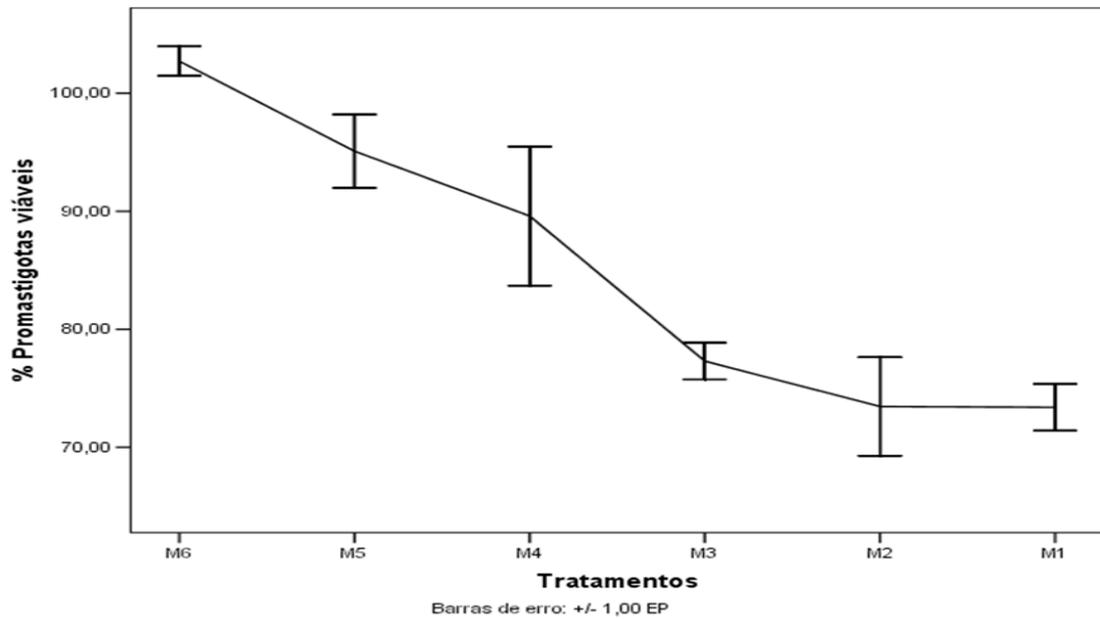


Gráfico 11 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) guyanensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (100 a 3,1 $\mu\text{g/mL}$) de miltefosine (M). As barras indicam o erro padrão da média. M1=100 $\mu\text{g/mL}$; M2=50 $\mu\text{g/mL}$; M3= 25 $\mu\text{g/mL}$; M4=2,5 $\mu\text{g/mL}$; M5=6,7 $\mu\text{g/mL}$; M6= 3,1 $\mu\text{g/mL}$.

No caso das promastigotas de *L. guyanensis* a atividade leishmanicida da G demonstrou valor de IC_{50} igual a 3.919,0 $\mu\text{g/ml}$ (GRÁFICO 12).

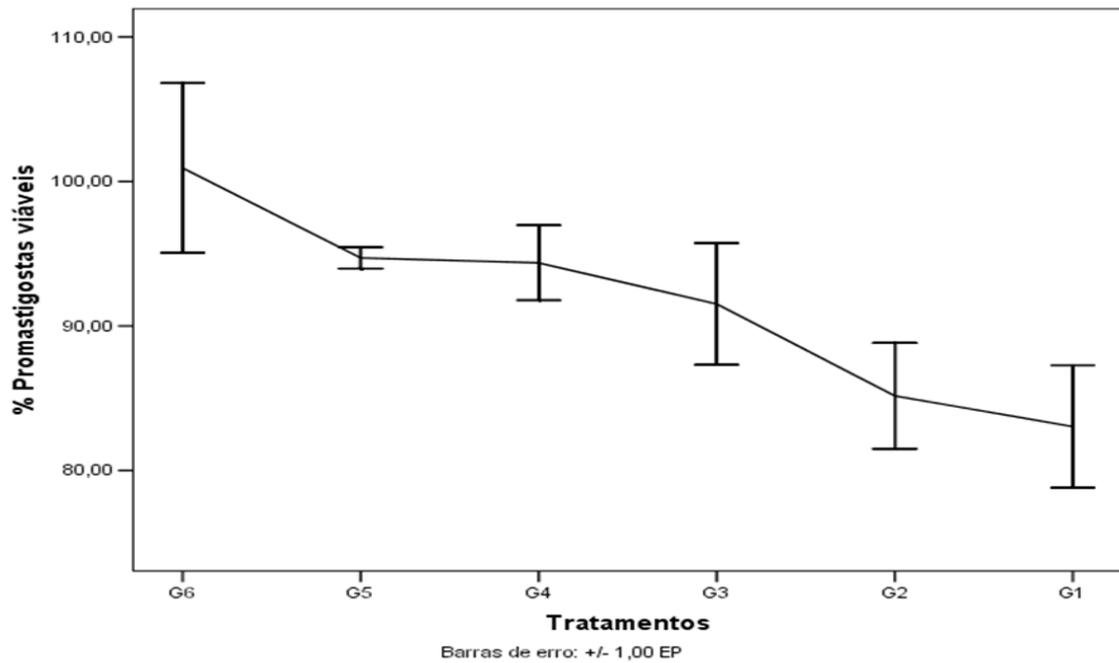


Gráfico 12 - Curva da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) guyanensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações (300 a 9,3 $\mu\text{g/mL}$) de N-metil glucamina (G). As barras indicam o erro padrão da média. G1=300 $\mu\text{g/mL}$; G2=150 $\mu\text{g/mL}$; G3=75 $\mu\text{g/mL}$; G4=37,5 $\mu\text{g/mL}$; G5=18,7 $\mu\text{g/mL}$; G6= 9,3 $\mu\text{g/mL}$.

No grupo M+G as concentrações 100+300 μ g/mL foram as que mais diminuíram a viabilidade celular das promastigotas de *L. guyanensis* (GRÁFICO 13).

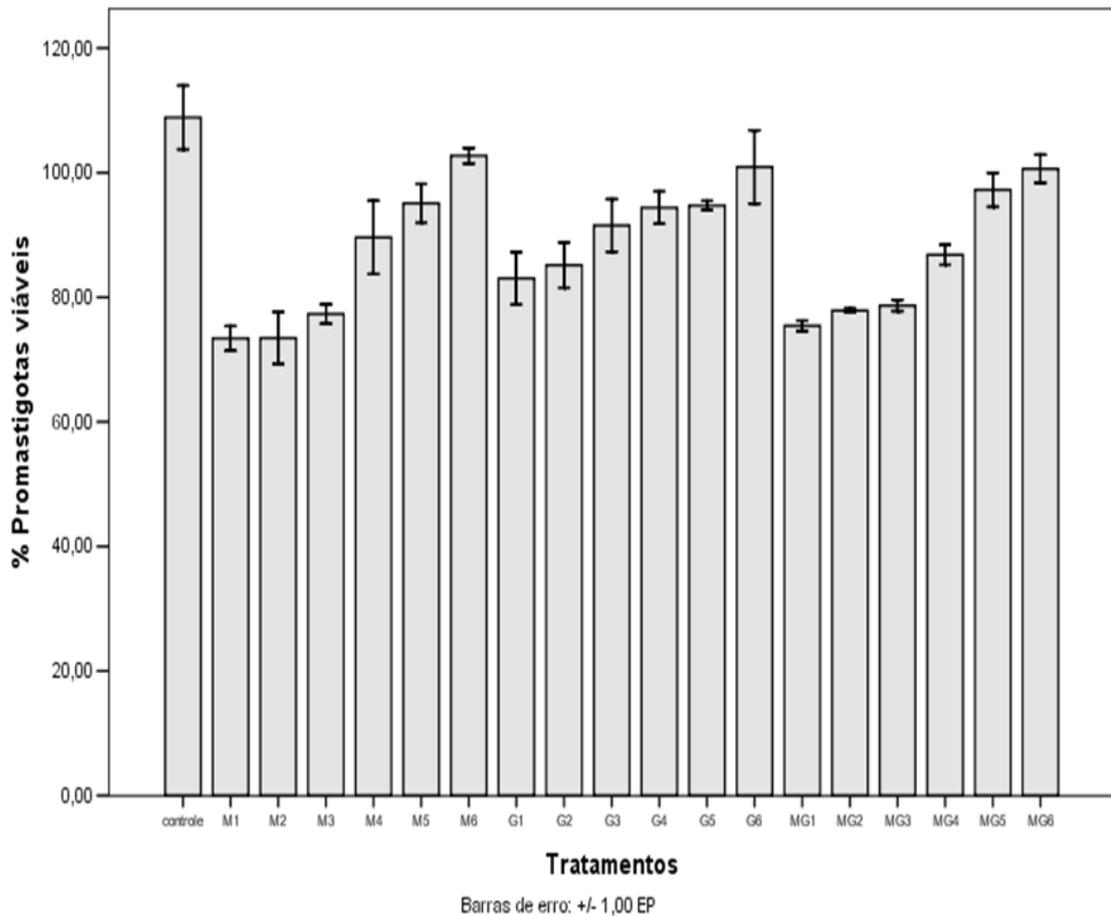


Gráfico 13 - Distribuição da viabilidade celular de *Leishmania (Viannia) guyanensis* determinada pelo ensaio de redução do MTT (% promastigotas viáveis) após incubação por 48 horas com diferentes concentrações de miltefosine (M), N-metil glucamina (G) e N+G. As barras indicam o erro padrão da média. MG=100+300 μ g/mL; MG2= 50+150 μ g/mL; MG3=25+75 μ g/mL; MG4=12,5+37,5 μ g/mL; MG5=6,7+18,7 μ g/mL; MG6=3,1+9,3 μ g/mL.

5.3 Estudo comparativo entre a miltefosine, N-metil glucamina e a associação da miltefosine com N-metil glucamina no tratamento de leishmaniose cutânea experimental:

5.3.1 Avaliação da eficácia dos tratamentos:

5.3.1.1 Medição da lesão cutânea (diâmetro das patas):

No grupo M (GRÁFICO 14) a média dos diâmetros das patas caiu de 2,1 (pré-tratamento) para 1,7 (pós-tratamento), com significância estatística ($p:0,004$). No grupo G (GRÁFICO 15) a média dos diâmetros das patas não apresentou diferença estatística no pré e pós-tratamento ($p: 0,407$). No grupo M+G (GRÁFICO 16) também não houve diferença estatística ($p:0,923$). A média do grupo C (GRÁFICO 17) cresceu de 1,9 para 2,2 ($p: 0,001$).

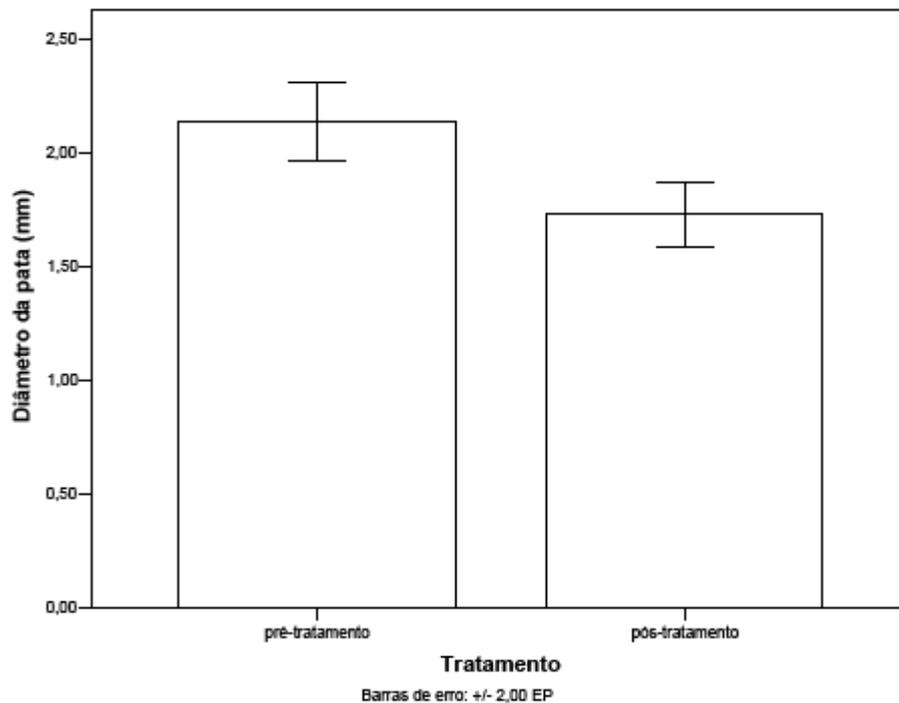


Gráfico 14 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos do grupo miltefosine (M) no pré-tratamento e após tratamento com miltefosine dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias.

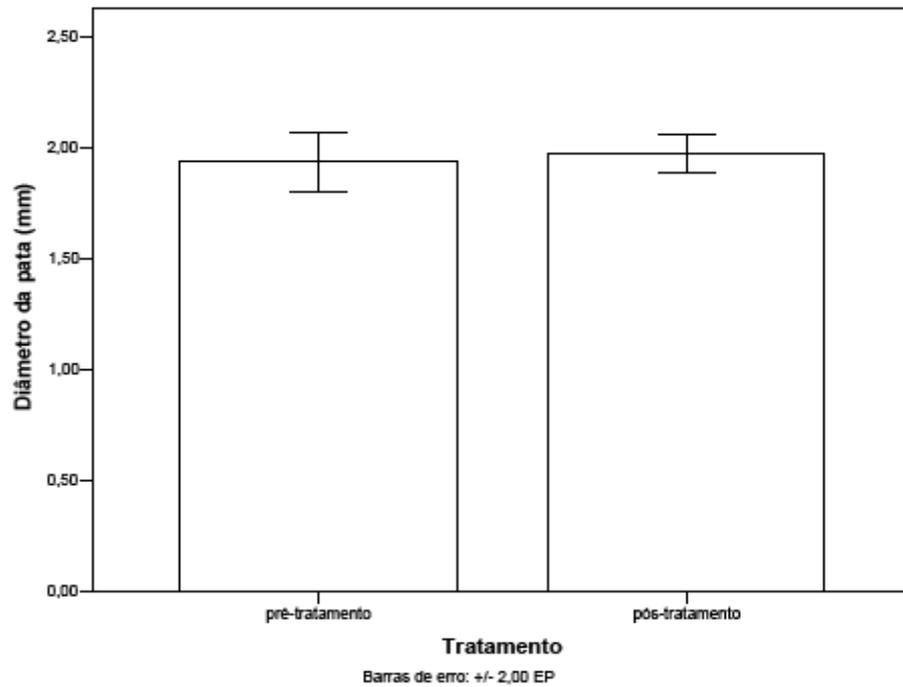


Gráfico 15 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos do grupo N-metil glucamina (G) no pré-tratamento e após tratamento com N-metil glucamina dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias.

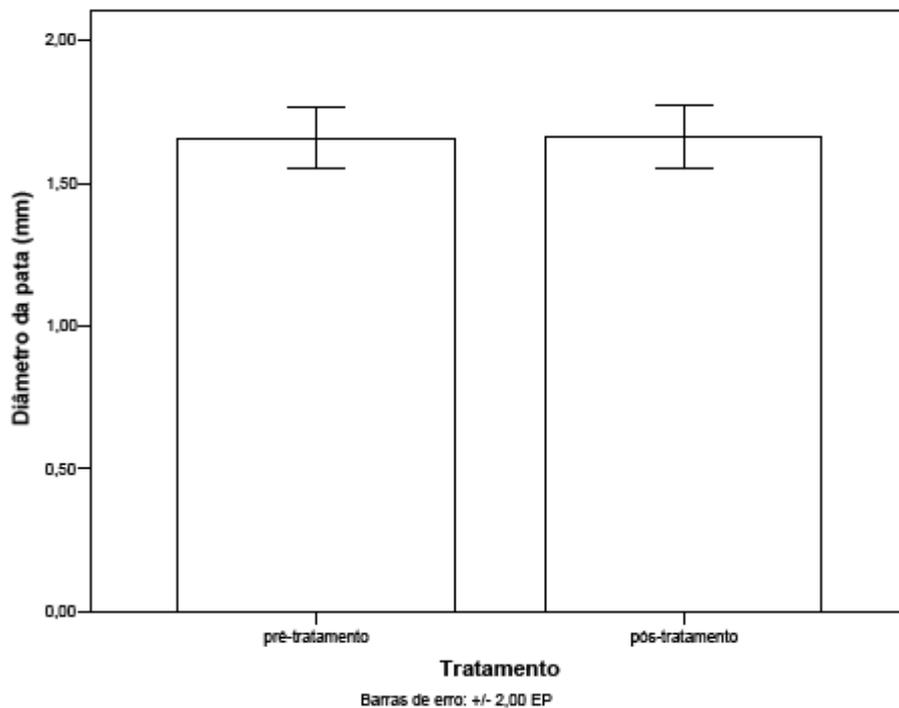


Gráfico 16 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos do grupo miltefosine + N-metil glucamina (M+G) no pré-tratamento e após tratamento com miltefosine dose de 20mg/kg/dia via oral e N-metil glucamina dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias.

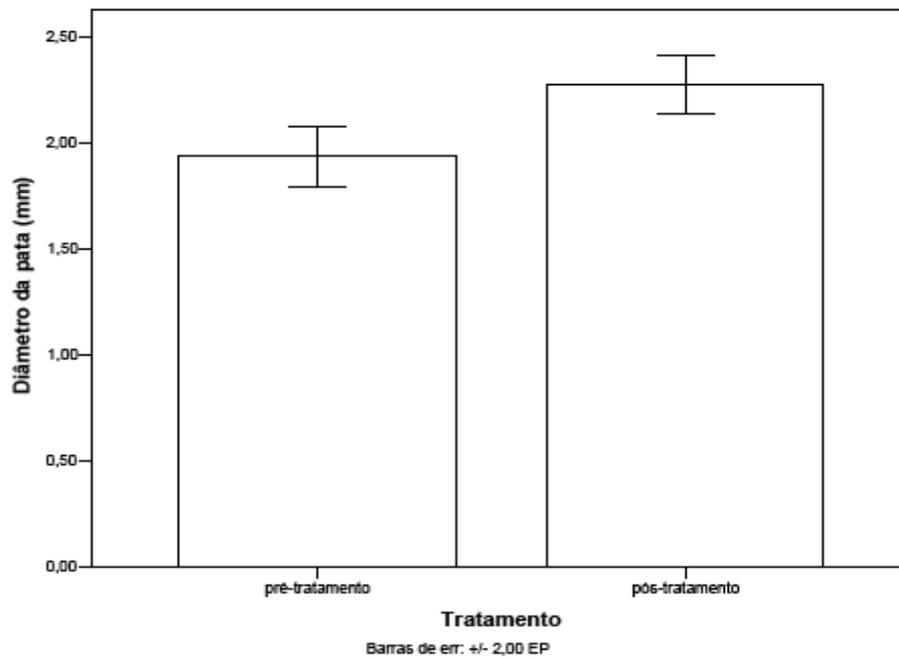


Gráfico 17 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos do grupo controle (C) sem tratamento.

No pré-tratamento, quando se comparou a distribuição do diâmetro das patas entre os grupos (GRÁFICO 18) observou-se que o único com diferença estatística significativa em relação aos outros grupos foi o M+G. No pós-tratamento essa diferença aumentou (GRÁFICO 19) sendo observadas diferenças estatísticas significantes entre os três grupos: C, M e M+G.

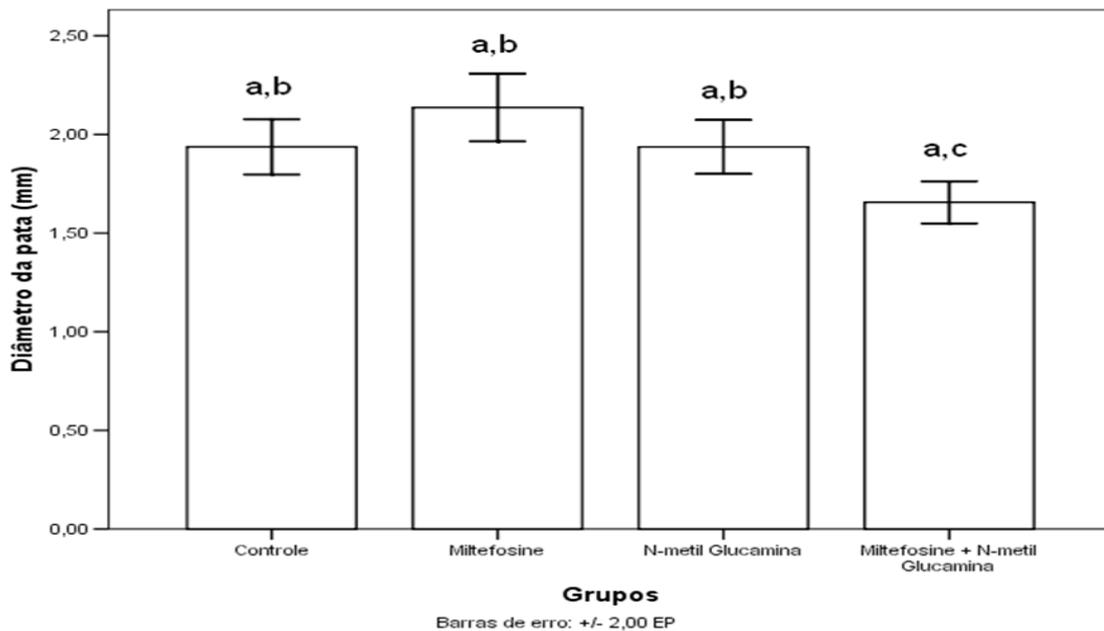


Gráfico 18 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos dos grupos miltefosine (M), N-metil glucamina (G), miltefosine+N-metil glucamina (M+G) e controle (C) no pré-tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística. As barras de erro representam duas vezes o erro padrão.

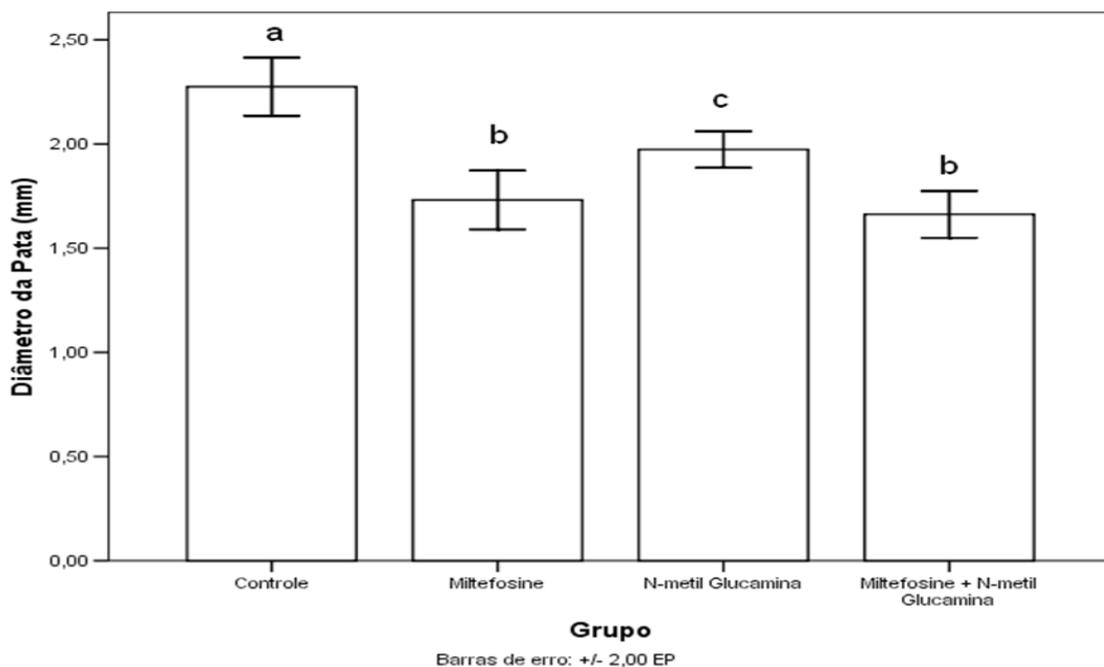


Gráfico 19 - Distribuição do diâmetro (mm) das patas dos camundongos dos grupos miltefosine (M), N-metil glucamina (G), miltefosine+N-metil glucamina (M+G) e controle (C) no pós-tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística. As barras de erro representam duas vezes o erro padrão. M=grupo tratado com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias. G=grupo tratado com N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias. M+G= grupo tratado com a associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores. C=grupo controle sem tratamento.

5.3.1.2 Exames parasitológicos:

5.3.1.2.1 Culturas e esfregaços:

Nas culturas (TABELA 2 e GRÁFICO 20) o grupo M obteve 50% de culturas negativas após o tratamento. O grupo M+G obteve 27,8%. O grupo G se igualou ao grupo C com 11,1%. No total foram realizadas 64 culturas, sendo 46 positivas (71,9%) e 18 negativas (28,1%).

Nos esfregaços (TABELA 3 e GRÁFICO 21) o grupo M obteve 38,5% e o grupo M+G obteve 42,3% de esfregaços negativos. O grupo G veio em seguida com 15,4% e o grupo C com 3,8%. Num total de 64 esfregaços, 38 foram positivos (59,4%) e 26 negativos (40,6%).

Tabela 2: Resultado das culturas de *Leishmania* feitas a partir da linfa das patas dos camundongos após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

		Grupos				Total
		Controle	Miltefosine	N-metil glucamina	Miltefosine + N-metil glucamina	
Cultura	Negativa	n 2	9	2	5	18
		% 11,1%	50,0%	11,1%	27,8%	100%
Cultura	Positiva	n 14	7	14	11	46
		% 30,4%	15,2%	30,4%	23,9%	100%
Total		n 16	16	16	16	64
		% 25%	25%	25%	25%	100%

P: 0,017

Tabela 3: Resultado da pesquisa de amastigotas nos esfregaços feitos a partir da linfa das patas dos camundongos após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

		Grupos				Total
		Controle	Miltefosine	N-metil glucamina	Miltefosine + N-metil glucamina	
Esfregaço	Negativo	n 1	10	4	11	26
		% 3,8%	38,5%	15,4%	42,3%	100%
Esfregaço	Positivo	n 15	6	12	5	38
		% 39,5%	15,8%	31,6%	13,2%	100%
Total		n 16	16	16	16	64
		% 25%	25%	25%	25%	100%

P: 0,000

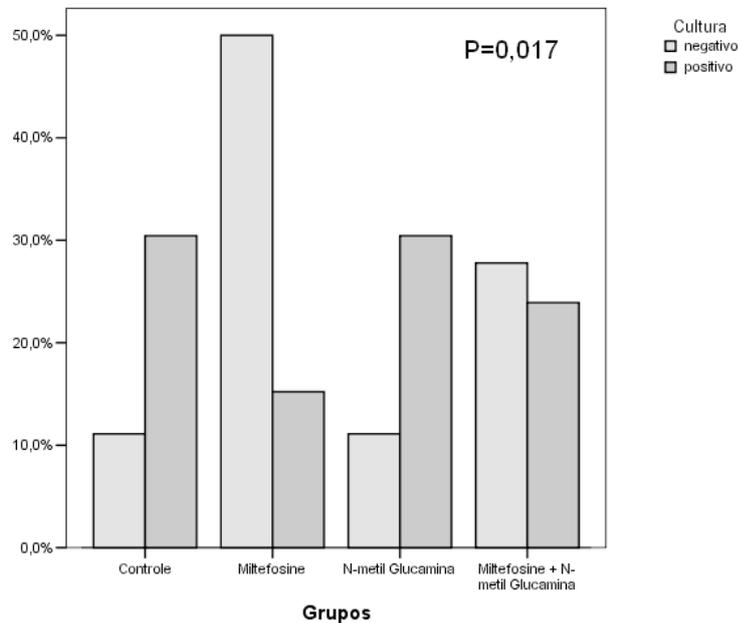


Gráfico 20 - Distribuição da porcentagem de culturas negativas e positivas feitas a partir da linfa das patas dos camundongos após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

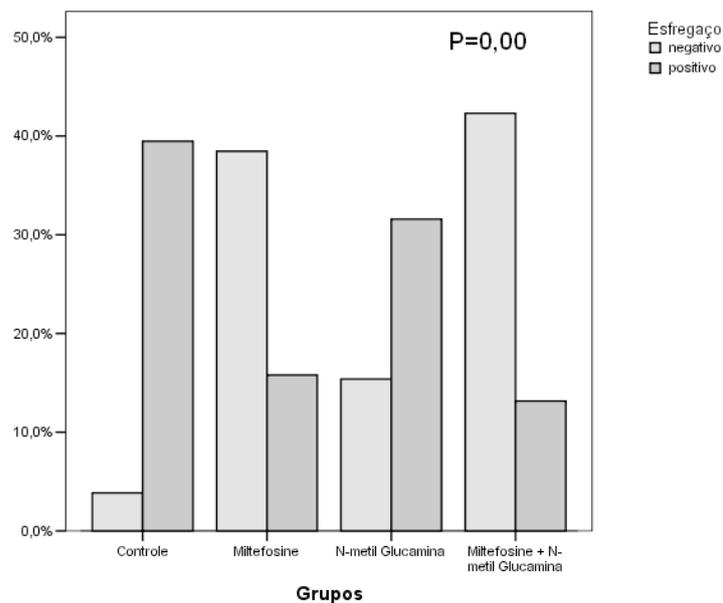


Gráfico 21- Distribuição da porcentagem de esfregaços negativos e positivos feitos a partir da linfa das patas dos camundongos após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

5.3.1.2.2 Diluição limitante:

O número de formas amastigotas por pata de camundongo, estipuladas a partir do programa ELIDA[®] nos grupos M e M+G foi nulo, no grupo C foi de $6,9 \times 10^5$ parasitos/mL, no grupo G foi de $1,8 \times 10^5$ parasitos/mL (GRÁFICO 22).

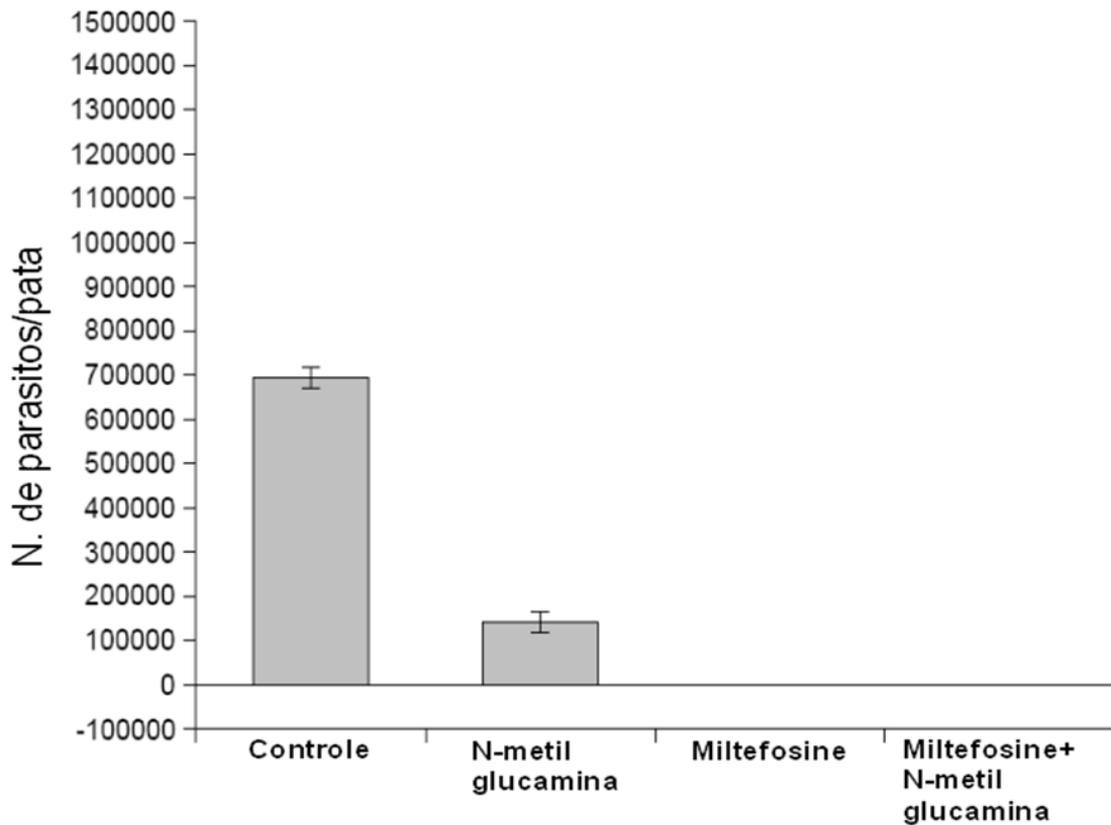


Gráfico 22 – Número de parasitos por pata de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* após tratamento com miltefosine na dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina na dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e controle sem tratamento.

6 DISCUSSÃO

6.1 Curvas de crescimento:

A realização de curvas de crescimento é necessária, pois existem estágios diferentes de *Leishmania sp* envolvidas no seu ciclo de vida. Os estágios mais importantes são: amastigota, promastigota pró-cíclica e promastigota metacíclica. O crescimento dos parasitos envolve uma fase log, na qual ocorre uma maior presença de promastigotas pró-cíclicas, uma fase estacionária, com maior concentração de promastigotas metacíclicas e uma fase final de declínio e morte. A fase log corresponde à intensa reprodução do parasito que em geral se apresenta mais arredondado, porém com baixa motilidade. A fase estacionária corresponde à fase mais infectante para o hospedeiro mamífero, pois as promastigotas metacíclicas se apresentam em grande número, sob formas mais afiladas e com baixa divisão, porém com maior motilidade e viabilidade (KILLICK-KENDRICK et al., 1974; BOGDAN, 1990; GOSSAGE et al., 2003).

Com os resultados das curvas de crescimento de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foi possível definir os dias em que as cepas tinham a maior probabilidade de se apresentarem no estágio de promastigotas metacíclicas e assim utilizá-las nos experimentos. Na pesquisa *in vivo*, por exemplo, o uso de promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* inoculadas nos camundongos realmente proporcionou maior infectividade e virulência, pois nas análises pré-tratamento, 100% das culturas e esfregaços feitos com as linfas das patas dos camundongos infectados mostraram-se positivos.

A curva de *L. amazonensis* (GRÁFICO 1) se apresentou de forma semelhante a outras curvas analisadas em diferentes experimentos (PASSOS, 2004; SILVA, 2008), com um crescimento logarítmico até o sexto dia de cultivo, a partir do qual começa a declinar. Após os resultados da curva observou-se que estatisticamente não haveria diferença na escolha do quinto, sexto ou sétimo dia de crescimento. Foi definido o sexto dia de crescimento no caso dessa espécie, tanto para os estudos *in vitro*, quanto para os estudos *in vivo*.

O crescimento mais rápido observado na curva de *L. braziliensis*, com fase exponencial máxima até o quinto dia de cultivo (GRÁFICO 2), não coincide com os resultados encontrados por Silva (2008) que observou no sétimo dia o crescimento máximo de suas cepas. Porém vale salientar que a comparação entre curvas de crescimento de diferentes estudos ou pesquisas podem apresentar diferenças significativas, mesmo se tratando de iguais

espécies, porque as condições de cultivo e a origem das cepas são diferentes. No caso dessa espécie as curvas mostraram que estatisticamente não haveria diferença entre o terceiro, quarto, quinto, sexto ou sétimo dia para a realização dos experimentos. Nos testes *in vitro* foi definido o quinto dia de crescimento para utilização das cepas desta espécie.

Na curva de *L. guyanensis* (GRÁFICO 3) observou-se que estatisticamente não haveria diferença na escolha do quarto, quinto, sexto ou sétimo dia para a realização dos experimentos, então foi escolhido o sexto dia para utilização dessa espécie nos testes *in vitro*.

As variações observadas nas curvas, sob as mesmas condições de cultivo, ressaltaram diferenças no tempo de replicação celular das três espécies. Observou-se que a *L. braziliensis* pareceu ter uma tendência a um crescimento mais rápido em relação às outras estudadas. Porém de uma forma geral elas se comportaram com o mesmo padrão de crescimento populacional, não havendo diferença estatística com relação ao mesmo dia.

6.2 Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine sobre as formas promastigotas de *Leishmania*:

Após a realização das curvas de crescimento foram iniciados os experimentos *in vitro*. O método colorimétrico (MTT) foi escolhido para avaliar a atividade leishmanicida das drogas baseado em dados da literatura que confirmam a utilização desta metodologia como a mais adequada para a avaliação da atividade antiparasitária de medicamentos, em substituição à contagem manual (SERENO; LEMESRE, 1997; SILVA, 2008).

Esse método, descrito inicialmente por Mosmann (1983) e com modificações sugeridas por Denizot e Lang (1986) avalia indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. O metil tiazol tetrazólio (MTT), que é um sal tetrazólico, de cor amarelo ouro, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se em um composto azul escuro (formazan).

Vale ressaltar que a avaliação com MTT utilizando apenas formas promastigotas apresenta algumas desvantagens, como limitação das drogas que precisam ser metabolizadas pelo hospedeiro (pró-droga) antes de atuar no parasito como é o exemplo da N-metil glucamina e, também, drogas que precisam ser concentradas pelo macrófago podem apresentar pequena atividade em formas promastigotas (SERENO; LEMESRE, 1997; SILVA, 2008).

Estudos anteriores mostraram que a miltefosine apresentou boa atividade tanto em formas promastigotas como em amastigotas de espécies envolvidas na leishmaniose visceral (SUNDAR et al., 1998; JHA et al.; 1999; MURRAY; DELPH-ETIENE, 2000; PARIS et al., 2004), porém até o momento não foram encontradas pesquisas *in vitro* utilizando formas promastigotas de espécies de *Leishmania* causadoras de LTA.

Com relação à sensibilidade das três espécies estudadas foi observado que a espécie mais sensível à ação da miltefosine foi a *L. amazonensis*, com o menor valor de IC₅₀, seguida pela *L. braziliensis* e finalmente a espécie menos sensível foi a *L. guyanensis* (TABELA 1).

Essa diferença intrínseca na sensibilidade das diferentes espécies de *Leishmania* à miltefosine também foi observada no estudo realizado por Yardley e colaboradores (2005) que avaliaram a sensibilidade de isolados clínicos de *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* e *L. lainsoni* à miltefosine, utilizando macrófagos infectados com amastigotas e em concentrações que variaram entre 30, 10, 3, e 1 µg/mL. As espécies mais sensíveis à miltefosine nesse estudo foram a *L. donovani* e *L. lainsoni* e as menos sensíveis foram *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

Teixeira e colaboradores (2007) avaliaram a ação *in vitro* da miltefosine em amastigotas onde as concentrações da droga variaram de 0,1 µg/mL a 10 µg/mL e onde a *L. amazonensis* também se apresentou como a espécie de maior sensibilidade à miltefosine, com menor valor de IC₅₀, porém a espécie *L. guyanensis* também obteve baixo valor de IC₅₀, ao contrário dos resultados encontrados no presente estudo. Provavelmente essa diferença tenha ocorrido por causa de diferenças na sensibilidade à droga entre formas amastigotas e promastigotas de *L. guyanensis*.

Com relação à sensibilidade das espécies à N-metil glucamina (TABELA 1) foi observado que a *L. braziliensis* foi a espécie mais sensível à ação da droga. Azeredo-Coutinho e colaboradores (2007) encontraram também esse mesmo resultado ao comparar a ação *in vitro* da N-metil glucamina em formas promastigotas das espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. tropica* e *L. mexicana*.

Comparando as duas drogas observou-se que a sensibilidade das espécies foi bem maior à miltefosine do que a N-metil glucamina (TABELA 1). Mas vale ressaltar que alguns estudos mostram que a ação *in vitro* da N-metil glucamina em formas promastigotas é 73 a 271 vezes menor do que a sua atividade em formas amastigotas (EPHROS et al., 1999). Esse fato pode ser explicado pela apresentação pentavalente da N-metil glucamina. Já foi demonstrado que compostos de antimônio trivalente são extremamente ativos para promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto que a forma pentavalente é

menos ativa (SERENO et al., 2001). A N-metil glucamina é considerada uma pró-droga, e pelos motivos já expostos, isso pode também ter interferido nos resultados.

No caso da associação miltefosine + N-metil glucamina (M+G) o cálculo do IC₅₀ não pôde ser obtido através do programa utilizado, pois as concentrações das drogas eram diferentes. Porém foi possível observar, baseando-se nos valores de densidade obtidos pelo MTT, que o grupo M+G foi o que mais diminuiu a porcentagem de promastigotas viáveis de *L. amazonensis* (GRÁFICO 7) em comparação com os outros grupos. Para *L. braziliensis* (GRÁFICO 10) e *L. guyanensis* (GRÁFICO 13) a associação das duas drogas não demonstrou diferenças importantes na diminuição da viabilidade das promastigotas em comparação com os outros grupos.

6.3 Estudo comparativo entre a miltefosine, N-metil glucamina e a associação da miltefosine com N-metil glucamina no tratamento de leishmaniose cutânea experimental:

O laboratório de Dermatologicologia vem pesquisando a ação da miltefosine no tratamento de leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, já registrando a eficácia dessa droga (FILHO et al., 2008). No presente estudo buscou-se também avaliar se essa eficácia seria aumentada associando-se a droga com a N-metil glucamina.

Inicialmente foram utilizados 80 camundongos divididos em quatro grupos de 20. No final tivemos perdas, por morte ou fuga, de 10 camundongos. Dois camundongos perdidos por fuga foram um do grupo miltefosine (M) e outro do grupo N-metil glucamina (G). Já dos oito camundongos perdidos por morte quatro foram do grupo Miltefosine + N-metil glucamina (M+G) que morreram durante ou após o tratamento, e quatro do grupo controle (C).

Analisando individualmente os resultados de cada grupo, observou-se que o grupo M teve melhor resultado, portanto foi considerado o tratamento mais eficaz. Nesse grupo houve uma diferença estatística significativa ($p=0,004$) nas medições do pré e pós-tratamento (GRÁFICO 14), ocorrendo uma diminuição significativa na distribuição do diâmetro das patas. O grupo C também obteve o mesmo resultado de significância estatística ($p=0,001$) só que a distribuição do diâmetro da patas aumentou no pós-tratamento (GRÁFICO 19), sendo esse o resultado esperado à medida que esse grupo não foi submetido a nenhum tratamento.

Nos outros dois grupos restantes, G (GRÁFICO 15) e M+G (GRÁFICO 16), não houve diferença estatística significativa na distribuição do diâmetro das patas após o tratamento. Esse resultado demonstrou que parece não ter havido sinergismo de ação na associação das duas drogas, coincidindo com resultados encontrados por Seifert e Croft (2006) que estudaram a interação da miltefosine com outras drogas *in vivo* e concluíram que a associação com o antimonial não teve significância. E também, corroborando com os estudos de Kuhlencord e colaboradores (1992), foi observada uma melhor resposta ao tratamento com miltefosine oral em comparação com o antimonial via parenteral.

A avaliação do tamanho das patas dos camundongos pode não ter correlação com o número de leishmânias no interior das mesmas, pois estudos mostram que em animais infectados experimentalmente o tamanho das lesões cutâneas causadas pelos parasitos podem não se correlacionar com o número de parasitos no interior da lesão (TITUS et al., 1985). Na verdade, lesões cutâneas podem curar, mas ainda conter parasitos. Assim, a capacidade de determinar a carga parasitária de animais infectados torna-se importante na avaliação da eficácia de um tratamento ou vacina.

Titus e colaboradores (1997) desenvolveram uma técnica simples de contagem de parasitos em tecidos infectados baseada no ensaio da diluição limitante. Essa técnica foi utilizada no presente estudo com o objetivo de quantificar o número de formas amastigotas encontradas nas patas dos camundongos após os tratamentos com miltefosine, N-metil glucamina e a associação das duas drogas.

A diluição limitante (GRÁFICO 22) mostrou que os resultados da avaliação do tamanho das patas dos camundongos tiveram uma relativa correlação com o número de leishmânias no interior das mesmas, pois esse método estimou o número de amastigotas por pata dos camundongos após o tratamento. No grupo C a distribuição do diâmetro das patas aumentou no pós-tratamento e na diluição limitante esse foi o grupo que obteve maior número de formas amastigotas por pata de camundongo. No grupo M ocorreu uma diminuição significativa na distribuição do diâmetro das patas após o tratamento e na diluição limitante não cresceram formas parasitárias após cultura, sendo zero o número de formas amastigotas estipuladas nas patas dos camundongos. No grupo G não houve diferença estatística na distribuição do diâmetro das patas após o tratamento e na diluição limitante esse grupo foi o segundo maior em número de formas amastigotas estipuladas por pata.

O grupo M+G foi o único que não demonstrou correlação da medição das patas com os resultados da diluição limitante, pois não houve diminuição estatística significativa no diâmetro das patas após o tratamento, porém na diluição limitante não cresceram parasitos nas

culturas. Esse resultado pode ter ocorrido porque apenas dois camundongos de cada grupo foram submetidos ao procedimento de análise pela diluição limitante, e provavelmente os dois camundongos, aleatoriamente escolhidos, do grupo M+G estavam entre aqueles com diminuição de carga parasitária após o tratamento.

Comparando os resultados negativos das culturas (TABELA 2) por grupos de tratamento observou-se que o grupo M foi o de maior efetividade. O grupo G teve o pior resultado se igualando com o grupo C.

Quanto à pesquisa de amastigotas nos esfregaços (TABELA 3) o grupo M+G foi o de melhor efetividade embora muito próximo do grupo M. O grupo G foi o de menor efetividade, com resultados próximos aos do grupo C.

Os resultados de culturas (GRÁFICO 20) e esfregaços (GRÁFICO 21) quando comparados entre si demonstraram o mesmo padrão de resposta para todos os grupos, porém em termos de resultados positivos e negativos observou-se que o diagnóstico através das culturas foi mais sensível, com 71,9% de culturas positivas, do que através dos esfregaços, que apresentou 59,4% de resultados positivos. Essa maior sensibilidade das culturas em relação à pesquisa de amastigotas por esfregaços já é conhecida e foi também observada em estudos anteriores (SAMPAIO et al., 2002).

Fazendo uma análise global dos resultados obtidos no presente experimento foram observados resultados coerentes e não contrastantes. Em toda seqüência para análise da eficácia dos tratamentos, através da medição das patas dos camundongos, culturas em meio NNN, esfregaços e culturas pela diluição limitante observou-se o mesmo padrão de resultados na eficácia das drogas utilizadas frente ao tratamento, todos eles com significância estatística. O grupo M ou M+G foram os de melhor efetividade em todas as análises.

6.4 Miltefosine:

A ação da miltefosine em espécies de *Leishmania* vem sendo estudada há aproximadamente 30 anos (CROFT et al, 1987). Inicialmente todos os estudos estavam relacionados com espécies causadoras de leishmaniose visceral. A partir de 2004 é que foram concluídas pesquisas envolvendo espécies causadoras de LTA (SANTA-RITA et al., 2004; SOTO et al., 2004). No Brasil, pesquisas com a miltefosine ainda são raras.

O uso dessa droga no tratamento da LTA seria de extrema importância para o Brasil, pois se trata de uma droga de via oral, com poucos efeitos adversos graves e de fácil administração.

O presente estudo se destaca ao avaliar a ação dessa droga nas formas promastigotas das três principais espécies envolvidas na LTA no Brasil; *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Também avalia sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental causada pela *L. amazonensis*, espécie considerada umas das mais importantes à medida que pode causar a leishmaniose cutânea difusa, de difícil tratamento e que está largamente distribuída em todas as regiões do País.

7 CONCLUSÕES

A miltefosine apresentou uma boa atividade leishmanicida nos testes *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;

As promastigotas da espécie *L. amazonensis* foram as mais sensíveis frente à ação da miltefosine nos testes *in vitro* e as promastigotas de *L. guyanensis* se mostraram praticamente insensíveis a mesma;

A miltefosine teve eficácia superior em comparação com a N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6 causada por *L. amazonensis*;

A associação da miltefosine com a N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6 causada por *L. amazonensis* não demonstrou superioridade de eficácia quando comparado ao uso da droga isolada;

A miltefosine mostrou eficácia superior à N-metil glucamina, tanto nos estudos *in vitro*, quanto na pesquisa *in vivo*;

São necessárias novas pesquisas experimentais visando verificar a ação da miltefosine em outras espécies de leishmânias patogênicas e concluir se essas diferenças teriam uma correlação com resultados terapêuticos de ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, T. M.; ROSA, G. G.; REZENDE, F. F. M. et al. Avaliação da terapêutica com antimoniais e isotionato de pentamidina em pacientes portadores de leishmaniose cutânea atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, suplemento I, p. 110, 2007.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v.10, n.3, p. 853-882, 2003.
- ALTMAN, F.P. Studies on the reduction of tetrazolium salts. **Histochemistry Journal**, v. 38, p.155-171, 1974.
- AMATO, V.S. Utilização do isotionato de pentamidina para o tratamento da leishmaniose mucosa. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 529-530, 1997.
- AMATO, V. S.; NICODEMO, A. C.; AMATO, J. G. et al. Mucocutaneous Leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with Liposomal Amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 341-342, 2000.
- AMATO, V. S.; TUON, F. F.; CAMPOS, A. et al. Tratamento de leishmaniose mucosa com formulação lipídica de anfotericina B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, suplemento I, p. 110, 2007.
- AZEREDO-COUTINHO, R. B. G.; MENDONÇA, S. C. F. et al. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *leishmania* species and correlates with response to therapy in american tegumentary leishmaniasis. **The Journal of parasitology**, v. 93, n. 3, p. 688-693, 2007.
- BARRET, T. V.; SENRA, M. S. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. **Parasitology Today**, v. 5, n. 8, p. 255-257, 1989.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n.4, p. 684-703, 1997.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. **Parasitology Today**, v. 6, n. 6, p.183-187, 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2007. 182 p.

BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas.** 1961. 90 f. Tese (Livre Docência) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 540-546, 2003.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; PORTO-DE-OLIVEIRA, L.; BRITO-CHAVES, B. F. et al. Estudo de 15 casos de falência do tratamento antimonial em pacientes com leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, suplemento I, p. 110, 2007.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, n.1, p.3-17, 2005.

CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; PENDERGAST, W.; CHAN, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, p.2633–2636, 1987.

CRUZ, I.; NIETO, J.; MORENO, J.; CAÑAVATE, C.; DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 357- 88, 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DEDET, J. P. The Parasite. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 261-268, 1999.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DESJEUX, P.; LEWIN, K. M. Leishmaniasis Public Health Aspects and Control. **Clinics in Dermatology**, v.14, n. 5, p. 417-23, 1996.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p. 3-15, 2003.

DIETZE, R.; MILAN, E. P.; BERMAN, J. D. et al. Treatment of brazilian kala-azar with a short course of Amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion). **Clinical Infectious Diseases**, v.17, p.981-986, 1993.

DORLO, T. P. C.; PIETER, P. A. M.; VAN THIEL, P. P. A. M. et al. Pharmacokinetics of Miltefosine in Old World Cutaneous Leishmaniasis Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.8, p. 2855-2860, 2008.

EPHROS, M.; BITNUN, A.; SHAKED, P.; WALDMAN, E.; ZILBERSTEIN, D. Stagespecific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 278-82, 1999.

ESCOBAR, P.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Activities of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine), AmBisome, and Sodium Stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in Immunodeficient Scid Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p.1872-1875, 2001.

FILHO, A. V. C.; LUCAS, I. C.; SAMPAIO, R. N. R. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 1-4, 2008.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

FURTADO, T. A. Terapêutica da leishmaniose americana - medicamentos de escolha. **Revista da Associação Médica de Minas Gerais**, n. 25, p. 108-113, 1974.

GOMES, A. C. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 67, n. 2, p. 55-60, 1992.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, n.3, p. 1027-1034, 2003.

GRIMALDI-JR, G. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 2, p. 195-215, 1982.

GROGL, M.; THOMASON, T. N.; FRANKE, E. D. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, p. 117-126, 1992.

HILGARD, P.; KLENNER, T., STEKAR, J.; UNGER, C. Alkylphosphocholines: a new class of membrane active anticancer agents. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 32, p. 90-95, 1993.

HUEB, M.; BARROS, A. B.; PAZIN, G. V. et al. Avaliação da eficácia do Leishvacin no tratamento da leishmaniose cutânea. **Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, suplemento I, p. 115-115, 2007.

JHA, T. K. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isothionate) in the treatment of resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 167-170, 1983.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P. et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 24, p. 1795-1800, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 269, 1974.

KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 8, p.1630-1634, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the new world: taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, v. 28, p. 44-48, 1972.

LIMA, E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. C. O.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LIMA, C. D.; SOUZA, L. C. Novas formas comerciais de anfotericina B. **Revista Ciências Médicas**, v. 14, n. 2, p. 187-197, 2005.

MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A. P., RAICK, N. A.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. Classificação histopatológica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 421-430, 1986.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging Anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, suplemento 2, p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROSA, P. C. et al. Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for american cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepagua region (Rio de Janeiro). Comparative study of results observed in 1974 and 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, n. 3 p. 149 –155 1980.

MAYRINK, W.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; BOTELHO, A. C. C. et al. Imunoterapia, imunoquimioterapia e quimioterapia no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, 2006.

MEDEIROS, A. C. R.; ROSELINO, A. M. F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 74, p. 329-336, 1999.

MIEKELEY, N.; MORTARI, S. R.; SCHUBACH, A. O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Anal Bioanal Chemical**, v. 372, n. 3, p. 495-502, 2002.

MONTENEGRO, J. A cútis-reação na leishmaniose. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 1, p. 323-330, 1926.

MORE B.; BHATT, H.; KUKREJA, V.; AINAPURE, S.S. Miltefosine: great expectations against visceral leishmaniasis. **Journal Postgrad Medicine**, v. 49, p. 101-103, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTTA, J. O. C. **Estudo comparativo da resposta imunológica e clínica entre a anfotericina B lipossomal e o N-metil glucamina em pacientes com a forma localizada da leishmaniose tegumentar americana (LTA)**. 2006. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília-DF.

MURRAY, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. **International Journal of Infectious Diseases**, v.4, n.3, p.158-177, 2004.

MURRAY, H. W.; DELPH-ETIENE, S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocoline (miltefosine) in mice deficient in T cells and activates macrophage microbicidas mechanisms. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, p. 795-799, 2000.

NAME, R. Q.; SAMPAIO, R. N. R.; NOGUEIRA, L. S. C. et al. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 3, p. 249-254, 2005.

NOGUEIRA L. S. C.; SAMPAIO R. N. R. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 76, p. 51-62, 2001.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S. Um esquema antimonial alternativo para ser empregado na leishmaniose cutânea quando altas doses de antimônio são indesejáveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39 n.4, p. 323-326, 2006(a).

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S. Resposta terapêutica bem sucedida de casos resistentes de leishmaniose mucocutânea a doses muito baixas de antimônio. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.4, p. 376-378, 2006(b).

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O. et al. Mucosal leishmaniasis (Espundia) responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 6, p. 321-325, 2000.

OLIVEIRA-NETO M. P.; SCHUBACH, A.; MATTOS, M.; COSTA, S. C.; PIRMEZ, C. Intralesional therapy of american cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil - an area of *Leishmania (V) braziliensis* transmission. **International Journal of Dermatology**, v.36, n. 6, p. 463-468, 1997.

OSEI, K.; FALKO, J. M.; NELSON, K. P.; STEPHENS, R. Diabetogenic effect of pentamidine. *In vitro* and *in vivo* Studies in a Patient with malignant insulinoma. **American Journal of Medicine**, v. 77, p. 41-46, 1984.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BREARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n. 3, p. 852-859, 2004.

PASSOS, J. P. S. **Padronização do Método de Produção de Antígeno de Montenegro**. 2004.74f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R. C.; SAMPAIO, R. N. R. 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**, v. 36, n. 3, p. 365-371, 2003.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p. 1-13, 1996.

PRASAD R.; KUMAR R.; JAISWAL B. P.; SINGH U. K. Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 71, p. 143-144, 2004.

RAHMAN, S. B.; BARI, A. U.; MUMTAZ, N. Miltefosine in cutaneous leishmaniasis. **Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan**, v. 17, n. 3, p. 132-135, 2007.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

RITMEIJER, K.; DEJENIE, A.; ASSEFA, Y. et al. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in na Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 357-364, 2006.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.5, p. 1076-1082, 1998.

ROBERTS, W. L. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexam and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p. 129-42, 2003.

RODRIGUES, A. M.; HUEB, M.; SANTOS, T. A. R R.; FONTES, C. J. F. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2006.

ROSS, R. Further notes on leishmania's bodies. **British Medical Journal**, v. 11, p.1401, 1903.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, n. 9, p. 581-596, 2007.

SALMAN, S. M.; RUBEIZ, N. G.; KIBBI, A. G. Cutaneous Leishmaniasis: Clinical Features and Diagnosis. **Clinics in Dermatology**, v.17, p. 291-296, 1999.

SAMPAIO, R. N. R.; PASSOS, S. K.; CASSICA, A. et al. Tratamento com pentamidina de seis casos da forma mucosa de leishmaniose tegumentar. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 63, n. 6, p. 439-442, 1988.

SAMPAIO, R. N. R.; MARSDEN, P. D. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B liposomal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 2, p. 125-128, 1997.

SAMPAIO, R. N. R.; DE PAULA, C. D. R. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 523-528, 1999.

SAMPAIO, R. N. R.; ANDRADE, G. B. et al. Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.77, n. 5, 2002.

SAMPAIO, R. N. R.; LUCAS, I. C.; COSTA FILHO, A.V. Use of oral miltefosine associated with meglumine antimoniate in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis caused by *L. (L) amazonensis*. **In: 3 th World Congress of Leishmaniasis**, p. 54, 2005.

SAMPAIO, R. N. R.; LUCAS, I. C.; COSTA FILHO, A.V. N-metil glucamine and topical miltefosine association in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 2007 (a).

SAMPAIO, R. N. R.; LUCAS, I. C.; TAKAMI H. L. Inefficacy of the association n-methyl glucamine and topical miltefosine in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 598-606, 2007 (b).

SANDS, M.; KRON, M.A.; BROWN, R. B. Pentamidina: a review. **Reviews of Infectious Diseases**, n. 7, p. 625-634, 1985.

SANTA-RITA, R. M.; HENRIQUE-PONS, A.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 704-710, 2004.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73-79, 2006.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis in vitro*. **Parasitology Research**, v. 83, n.4, p. 401-3, 1997.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I. et al. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.

SCHRANER, C.; HASSE, B. et al. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 12, p. 120-124, 2005.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 342-349, 2006.

SCHMIDT-OTT, R.; KLENNER, T.; OVERATH P.; AEBISCHER, T. Topical treatment with hexadecylphosphocoline (Miltefosine) efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 1, p. 85-90, 1999.

SILVA, D. G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas.** 2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina-SC.

SOLOMON, M.; BAUM, S.; BARZILAI, A. et al. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 4, p. 612-616, 2007.

SOTO, J.; TOLEDO, J. T. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 7-7, 2007.

SOTO, J.; SOTO, P. Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. **Biomédica**, v. 26, suplemento 1, p. 207-217, 2006.

SOTO, J.; ARANA, B. A.; TOLEDO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**, v. 38, p. 1266-1272, 2004.

SUNDAR, S.; ROSENKAIMER, F.; MAKHARIA, M. et al. Trial of miltefosine for visceral leishmaniasis. **The Lancet**, v. 352, p.1821-1823, 1998.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p.1739-1746, 2002.

TASWELL, C. Limiting dilution assays for the separation, characterization, and quantitation of biologically active particles and their clonal progeny. **Cell Separation: Methods and Selected Applications**, v. 4, n. 6, p. 109–145, 1987.

TEIXEIRA, E. M.; GALUPPO, M. K.; RABELO, A. et al. Miltefosina *in vitro* é ativa sobre as espécies de *Leishmania* spp. de importância nosológica no Brasil. In: **XXIII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses**, p. 52, 2007.

TITUS, R. G., MARCHAND, M. et al. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite immunology**, v. 7, n. 5, p. 545-555, 1985.

TITUS, R. G., LIMA, H. C., BLEYENBERG, J. A. Simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 2, p. 80-81, 1997.

TORO, G. R. Leishmaniasis. **Biomédica**, v.31, n. 3, p.77-98, 1983.

TROYA, J.; CASQUERO, A.; REFOYO, E. et al. Long term failure of miltefosine in the treatment of refractory visceral leishmaniasis in AIDS patients. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 40, n.1, p. 78-80, 2007.

TUON, F. F.; GRAF, M. E.; SIQUEIRA, A. M.; GOULART, S. P.; AMATO, V. S. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana – uma revisão sistemática com metanálise. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, suplemento I, p. 110, 2007.

URDAPILLETA, A. A. A. **Atividade de substâncias isoladas de líquens sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis***. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília-DF.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3010–3015, 2004.

VIANNA, G. O. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. **Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia**, v.4, p.426-428, 1912.

VIANNA, G. O. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar). **Brasil Médico**, p. 25-411. 1911.

WEIGLE, K. A.; LABRADA, L. A.; LOZANO, C.; SANTRICH, C.; BARKER, D. C. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 601-606, 2002.

WHO (World Health Organization). Cutaneous leishmanioses: why are you neglecting me? Informal Consultative Meeting for the Control of Cutaneous Leishmaniasis in the Middle East and Maghreb. Geneva. 2007.

WOHRL, S.; SCHNEDL, J.; AUER, H. et al. Successful treatment of a married couple for American leishmaniasis with miltefosine. **Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology**, v. 22, n. 2, p. 258-259, 2008.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. et al. The sensitivity of clinical isolates of leishmania from Peru and Nepal to miltefosine. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 272-275, 2005.

ZANCANARO, P. C. Q.; SAMPAIO, R. N. R. et al. Primeiro relato brasileiro de tratamento, com miltefosine oral, da forma mucosa de leishmaniose tegumentar americana refratária, por 25 anos, ao arsenal terapêutico específico. In: **XXIII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas e Leishmanioses**, p. 48-49, 2007.

ZERPA, O.; ULRICH, M.; BLANCO, B. et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. **British Journal of Dermatology**, v.156, p. 1328–1335, 2007.

ANEXOS

ANEXO A- Declaração da avaliação e aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 27 de maio de 2008.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MILTEFOSINE, N-METIL GLUCAMINA E A ASSOCIAÇÃO DA MILTEFOSINE COM N-METIL GLUCAMINA NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS"**, UNBDOC nº 35406/2008, sob responsabilidade da Profa. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA

ANEXO B- Valores dos números de promastigotas durante sete dias de contagem em câmara de Neubauer para realização de curvas de crescimento.

Dias	promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	promastigotas de <i>L. guyanensis</i>
1	0,25 0,92 0,54	0,50 0,98 1,20	0,58 0,62 0,95
2	0,64 1,20 0,87	0,75 1,75 2,40	0,95 0,98 1,62
3	1,15 2,25 1,40	0,94 3,45 3,55	1,26 2,11 3,45
4	2,95 2,92 1,98	2,75 6,52 4,98	1,68 2,94 4,60
5	4,54 3,45 3,95	3,44 8,00 6,50	5,89 3,00 6,20
6	5,50 3,80 6,25	2,47 5,22 4,52	6,30 4,40 7,40
7	3,85 3,40 4,45	1,61 4,44 2,49	4,30 2,27 4,60

ANEXO C - Valores das absorvâncias de miltefosine (M), N-metil glucamina (G) e miltefosine + N-metil glucamina (M+G) sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* obtidos através do leitor de ELISA 570 nm.

M (µg/mL)	100	50	25	12,5	6,2	3,1	Controle
<i>L. amazonensis</i>	0,264	0,265	0,246	0,204	2,458	0,271	0,660
	0,255	0,249	0,238	0,191	0,199	0,287	0,384
	0,255	0,246	0,222	0,404	0,870	0,289	0,522
	0,243	0,242	0,227	0,213	0,204	0,294	0,624
<i>L. braziliensis</i>	0,527	0,484	0,526	0,451	0,566	0,637	0,963
	0,501	0,452	0,551	0,561	0,572	0,649	0,945
	0,528	0,432	0,498	0,750	0,520	0,932	1,080
	0,513	0,489	0,512	0,578	0,565	0,698	0,989
<i>L. guyanensis</i>	0,544	0,623	0,594	0,573	0,693	0,766	0,728
	0,493	0,527	0,554	0,758	0,743	0,759	0,668
	0,607	0,495	0,562	0,593	0,501	0,726	0,765
	0,560	0,494	0,541	0,685	0,633	0,740	0,698
G (µg/mL)	300	150	75	37,5	18,7	9,3	Controle
<i>L. amazonensis</i>	0,202	0,594	0,349	0,320	0,812	0,378	0,660
	0,277	0,363	0,314	0,320	0,998	0,340	0,384
	0,266	0,337	0,314	0,312	0,802	0,365	0,522
	0,295	0,366	0,300	0,340	0,288	0,356	0,624
<i>L. braziliensis</i>	1,120	0,838	0,494	0,545	0,460	0,592	0,963
	0,402	0,396	0,584	0,739	0,423	0,541	0,945
	0,409	0,478	0,505	0,712	0,487	0,610	1,080
	0,519	0,485	0,514	0,579	0,456	0,698	0,989
<i>L. guyanensis</i>	0,600	0,700	0,638	0,639	0,695	0,729	0,728
	0,676	0,591	0,758	0,729	0,680	0,857	0,668
	0,616	0,595	0,640	0,756	0,702	0,686	0,765
	0,526	0,594	0,629	0,680	0,681	0,667	0,698
M+G (µg/mL)	100+300	50+150	25+75	12,5+37,5	6,2+18,7	3,1+9,3	Controle
<i>L. amazonensis</i>	0,437	0,237	0,229	0,211	0,229	0,296	0,660
	0,267	0,240	0,254	0,205	0,553	0,314	0,384
	0,263	0,223	0,214	0,230	0,264	0,308	0,522
	0,231	0,250	0,218	0,200	0,308	0,297	0,624
<i>L. braziliensis</i>	0,506	0,505	0,475	0,482	0,615	0,697	0,963
	3,407	3,617	0,647	0,689	0,907	0,655	0,945
	0,482	0,786	0,720	0,681	0,462	0,775	1,080
	0,519	0,489	0,589	0,600	0,458	0,678	0,989
<i>L. guyanensis</i>	0,566	0,555	0,548	0,661	0,659	0,733	0,728
	0,717	0,567	0,429	0,632	0,754	0,756	0,668
	0,567	0,553	0,560	0,604	0,721	0,686	0,765
	0,578	0,555	0,591	0,631	0,698	0,755	0,698

ANEXO D – Valores dos diâmetros (mm) das patas dos camundongos dos grupos miltefosine, N-metil glucamina, miltefosine+N-metil glucamina e controle no pré-tratamento e após tratamento com miltefosine dose de 20mg/kg/dia, via oral, durante 10 dias, N-metil-glucamina dose de 400mg Sb⁺⁵/Kg/dia via intramuscular, durante 10 dias, associação da miltefosine e N-metil-glucamina nas mesmas dosagens, vias de administrações e tempo anteriores e grupo controle sem tratamento.

Grupos	Diâmetro da pata (pré-tratamento)	Diâmetro da pata (pós-tratamento)	Grupos	Diâmetro da pata (pré-tratamento)	Diâmetro da pata (pós-tratamento)
Miltefosine	2,5	2,0	N-metil glucamina	2,0	1,8
	2,0	2,0		1,9	2,1
	2,0	1,9		2,0	2,0
	2,5	1,5		1,9	1,9
	1,9	2,0		1,9	2,2
	2,0	1,8		1,9	2,0
	2,0	1,7		1,9	2,0
	3,0	1,5		1,5	2,0
	3,0	1,5		2,0	2,0
	2,1	2,0		1,9	2,1
	2,1	1,2		1,9	2,0
	2,1	1,2		2,1	2,1
	2,2	2,1		3,0	2,1
	2,0	1,6		1,9	2,0
	1,9	2,0		1,9	2,0
	2,0	1,7		1,8	1,5
	2,0	2,0		1,5	2,2
	1,8	1,2		2,0	1,5
	1,5	2,0		1,8	2,0
	Miltefosine + N-metil glucamina	1,5		1,5	Controle
1,7		2,0	1,6	2,1	
1,5		2,0	1,6	2,0	
2,1		2,0	2,0	2,1	
1,5		1,5	2,0	2,2	
1,5		1,5	1,5	2,2	
1,6		1,5	1,5	2,1	
1,5		2,0	2,1	3,0	
1,5		1,5	2,1	2,0	
1,5		1,5	2,1	2,1	
1,8		1,5	2,2	2,5	
1,9		1,8	2,0	2,1	
1,5		1,5	2,0	2,5	
1,5		1,5	2,1	2,0	
1,9		1,8	2,5	2,5	
2,0		1,5	2,0	2,5	
2,0					
1,8					
2,0					
2,0					