

CHARLENE BARRETO PONTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MILTEFOSINA SOBRE A VIABILIDADE E
AS FUNÇÕES DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS
C57BL/6**

Brasília
2011

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CHARLENE BARRETO PONTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MILTEFOSINA SOBRE A VIABILIDADE E
AS FUNÇÕES DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS
C57BL/6**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Selma Aparecida Souza Kückelhaus

Brasília
2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 988713.

Ponte, Charlene Barreto.
P813a Avaliação do efeito da miltefosina sobre a viabilidade
e as funções de macrófagos peritoneais de camundongos
C57BL/6 / Charlene Barreto Ponte. -- 2011.
103 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,
Faculdade de Ciências da Saúde, 2011.

Inclui bibliografia.

Orientação: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio ; co-orientação:
Selma Aparecida Souza Kückelhaus.

1. Leishmaniose. 2. Fagocitose. 3. Macrófagos. I. Sampaio,
Raimunda Nonata Ribeiro. II. Kuckelhaus, Selma Aparecida
Souza. III. Título.

CDU 616.993.161

CHARLENE BARRETO PONTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MILTEFOSINA SOBRE A VIABILIDADE E
AS FUNÇÕES DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS
C57BL/6**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 29 de abril de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Luciana Menezes da Silva Flannery
Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Anamélia Lorenzetti Bocca
Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Eloisa Dutra Caldas
Universidade de Brasília

A Deus, que com seu infinito amor, faz-me vencedora.

Ao meu esposo que é meu grande incentivador e um sábio conselheiro. Uma pessoa escolhida por Deus para abençoar a minha vida, sonhar comigo os meus sonhos e apoiar-me em todos os momentos.

A meus queridos pais, Luiz Eranildo Façanha Barreto e Elizeuda Martins Barreto, pelo amor e carinho, pelo exemplo de vida e por torcerem tanto por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu infinito amor e por iluminar meus passos sempre.

À professora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, que acreditou e confiou na minha capacidade profissional e aceitou ser minha orientadora, mesmo sabendo que os desafios seriam muitos. Agradeço a oportunidade e por ter me repassado tantos conhecimentos e experiências.

À professora Selma Aparecida Souza Kückelhaus, pois sem ela a execução deste trabalho não seria possível. Um exemplo de profissional dedicada às atividades acadêmicas, que aceitou ser minha co-orientadora e deste então esteve à frente de cada fase deste estudo. Repassou-me ensinamentos, inclusive de estatística, que foram tão úteis na análise dos resultados. Agradeço por tudo que fez por mim e por este trabalho.

À professora Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira que permitiu a minha permanência no laboratório de Imunologia Celular para que eu realizasse os ensaios, colaborando para a concretização deste estudo.

À indústria farmacêutica Zentaris GmbH que doou a miltefosina ao Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

À Juliana Saboia Fontenele e Silva, que juntamente com a professora Raimunda, cedeu-me gentilmente a miltefosina, tornando viável este estudo.

À amiga e doutoranda Érica Alessandra Rocha Alves, que foi uma pessoa enviada por Deus para me ajudar nos momentos mais difíceis dos ensaios imunológicos. Agradeço os ensinamentos, a paciência, as idéias e a disponibilidade.

Ao amigo Ricardo Fontoura, que conheci durante as aulas do mestrado e que marcou a minha trajetória nesta Pós-graduação, quando intermediou o meu encontro com a professora Raimunda Nonata. Agradeço também por ter me cedido alguns camundongos e por ter sido parceiro no manejo dos mesmos.

À amiga e doutoranda Ada Amália Ayala Urdapilleta com quem compartilhei tantos momentos difíceis neste mestrado. Agradeço as sugestões e a transferência de conhecimento.

À Shirley Claudinho Pereira Couto, que me ajudou na preparação dos reagentes, colaborou nos ensaios de fagocitose e sempre se mostrou disposta a apoiar durante a fase experimental.

À Luciana de Magalhães Leite, que me ajudou bastante na realização dos ensaios, sempre se mostrou disponível e com uma alegria contagiante. Agradeço o companheirismo, a paciência, a torcida, o auxílio na preparação e esterilização dos materiais. E além de tudo isso, por ter sido capaz de permanecer no laboratório em horários atípicos para que meus experimentos transcorressem da melhor forma possível.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa do laboratório de Imunologia Celular e do laboratório de Dermatocologia da Universidade de Brasília, pelos momentos compartilhados, pelas reuniões científicas e por terem me acolhido com muito carinho.

À dona Maria, uma senhora humilde e muito trabalhadora, que colaborou no cuidado dos animais no biotério e sempre esteve disposta a ajudar-me no que fosse necessário.

Ao Sr. Nelson, que tão prontamente preparou o meio RPMI utilizado neste estudo.

Aos meus queridos irmãos, Erandir Maria Barreto Araújo e Evaldo Néco Barreto Neto, por fazerem parte da minha história e por serem tão especiais para mim.

A todos os meus colegas de trabalho do Hospital das Forças Armadas, pela compreensão e pelas trocas de plantão quando precisei. À chefia da unidade que me possibilitou o cumprimento de uma escala compatível com as atividades do mestrado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa. Que Deus abençoe a cada um.

RESUMO

As leishmanioses têm gerado impacto na saúde pública e fazem parte do grupo de doenças negligenciadas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). O tratamento constitui um desafio de alta complexidade por se tratar de uma doença de difícil controle e cujos medicamentos disponíveis são injetáveis, têm alta toxicidade e são passíveis de falha terapêutica. A miltefosina (hexadecilfosfocolina) oral tem se mostrado eficaz e segura no tratamento da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral, no entanto, pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação e seus efeitos sobre os macrófagos, células parasitadas pelas leishmânias. Este estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito da miltefosina sobre a viabilidade dos macrófagos, além de testar a influência da droga sobre a capacidade fagocitária e sobre a produção de espécies oxidativas por macrófagos peritoneais dos camundongos da linhagem C57BL/6. Para os testes de viabilidade celular, utilizou-se o método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium) e partiu-se das concentrações de 1200 e 1600µg/mL da miltefosina e as demais foram obtidas por diluição seriada. Para os demais testes foram empregadas as doses: 10, 50 e 100µg/mL de miltefosina. A capacidade fagocitária foi avaliada utilizando-se 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae*, sensibilizadas ou não com o soro dos camundongos. A produção de óxido nítrico foi determinada pela reação de Griess e o peróxido de hidrogênio determinado pelo teste de oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Os resultados indicaram um aumento na atividade mitocondrial, portanto as células permaneceram viáveis na presença de diferentes doses de miltefosina. Isso foi demonstrado pelo progressivo aumento no percentual de redução do MTT ($p < 0,05$, teste t pareado). A droga aumentou em 53% a fagocitose na presença de *S. cerevisiae* não sensibilizadas nas preparações incubadas com 50µg/mL de miltefosina ($p < 0,001$, teste de Wilcoxon), devido ao aumento no percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose, embora tenha diminuído a média de leveduras fagocitadas. Na presença de *S. cerevisiae* sensibilizadas houve aumento do índice fagocitário com 10µg/mL, alterando a mediana de 202,0 para 382,5; e com 50µg/mL da droga, alterando a mediana de 202,0 para 602,0 ($p < 0,001$, teste de Wilcoxon), pois aumentou o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e a média de *S. cerevisiae* ingeridas pelos macrófagos. Todas as concentrações de miltefosina testadas diminuíram, pelo menos 93%, a produção de óxido nítrico pelos macrófagos em relação à produção basal ($33,1 \pm 15,0$) ou estimulada com lipopolissacarídeo ($50,2 \pm 17,4$) ($p < 0,001$, teste t pareado); porém, não afetou a produção de peróxido de hidrogênio ($p > 0,05$, teste t pareado). Portanto, este estudo mostrou que a miltefosina foi capaz de influenciar importantes funções do sistema imune inato dos macrófagos, principalmente potencializando a fagocitose. Além disso, a inibição da produção de óxido nítrico e a não alteração da produção de peróxido de hidrogênio sugerem que a ação microbicida da droga ocorre independente da produção destes radicais, por ação direta da miltefosina sobre o parasito. Isso pode trazer importantes implicações para o emprego deste medicamento na prática clínica, podendo trazer bons resultados aos indivíduos imunodeprimidos; além de também favorecer a redução dos efeitos deletérios gerados pelo excesso de radicais e, conseqüentemente, diminuir a imunopatogênese da leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose; Fagocitose; Macrófagos; Miltefosina; Óxido Nítrico; Peróxido de Hidrogênio.

ABSTRACT

The leishmaniasis have generated impact on public health and are part of the group of neglected diseases according to World Health Organization (WHO). Treatment is a highly complexity challenge because it is a difficult disease to control and whose medications available are injectable, have high toxicity and are susceptible of therapeutic failure. The oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) is an effective and safe treatment of cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous and visceral; however, little is known about its mechanism of action and its effects on macrophages, cells infected by leishmania. This study aimed at evaluating, in vitro, the effect of miltefosine on the viability of macrophages, and at testing the influence of drug on the phagocytic capacity and the production of oxidative species by peritoneal macrophages of mice C57BL/6. For the tests of cell viability, the MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium) method was used and started from the concentrations of 1200 and 1600 µg/mL of miltefosine and the others were obtained by serial dilution. For all other tests doses of 10, 50 and 100 µg/mL de miltefosine were used. The phagocytic capacity was assessed using 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae*, sensitized or not with the serum of mice. Nitric oxide production was determined by Griess reaction and the hydrogen peroxide production was determined by the phenol red oxidation in the presence of peroxidase. The results indicated a progressive increase in mitochondrial activity and therefore the cells remained viable in the presence of different doses of miltefosine. This was demonstrated by the progressive increase in the percentage of MTT reduction ($p < 0,05$, paired t test). The drug increased phagocytosis by 53% using nonsensitized *S. cerevisiae* in preparations incubated with 50 µg/mL of miltefosine ($p < 0,001$, Wilcoxon test) due to the increased percentage of macrophages involved in phagocytosis, although the average number of phagocytosed yeasts has decreased. In the presence of sensitized *S. cerevisiae*, the phagocytic index increase with 10 µg/mL by changing the median of 202,0 to 382,5; and with 50 µg/mL, changing the median of 202,0 to 602,0 ($p < 0,001$, Wilcoxon test), because the percentage of macrophages involved in phagocytosis and the average number *S. cerevisiae* ingested by macrophages was increased. All concentrations of miltefosine tested decreased at least 93%, nitric oxide production by macrophages in relation to the basal production ($33,1 \pm 15,0$) or stimulated with lipopolysaccharide ($50,2 \pm 17,4$) ($p < 0,001$, paired t test); however, it did not affect the hydrogen peroxide production ($p > 0,05$, paired t test). Therefore, this study showed that miltefosine was able to influence important functions of the innate immune system of macrophages, especially enhancing phagocytosis. Furthermore, the inhibition of nitric oxide production and the no change in the hydrogen peroxide production suggests that the antimicrobial action of the drug happens independently of production of these radicals, by direct action of miltefosine against the parasite. This can bring important implications for the use of this drug in clinical practice, and it can generate good results to the immunosuppressed individuals, in addition to also promote the reduction of harmful effects caused by excess of radicals and, consequently, reduce the immunopathogenesis of the leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; Phagocytosis; Macrophage; Miltefosine; Nitric Oxide; Hydrogen Peroxide.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química da miltefosina. Fonte: Rath et al., 2003..... 25
- Figura 2.** Câmara de Neubauer (a.); quadrantes da câmara de Neubauer (b.)..... 27
- Figura 3.** Esquema da técnica utilizando o MTT. Foram incubadas 2×10^5 células/escavação com diferentes concentrações da miltefosina por 1 hora a 37°C em câmara contendo CO₂ (A). Após este período, foram adicionados 10µL de MTT a todos os poços (B) e a placa foi novamente incubada por 4 h a 37°C (C). Em seguida, adicionou-se 50µL de SDS a 10% a todos os poços para solubilização dos cristais de formazan (D). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm (E). Esquema adaptado (86)..... 29
- Figura 4.** Efeito de diferentes concentrações de miltefosina sobre células peritoneais de camundongos C57BL/6 (n= 9) após a incubação por 4 horas na presença de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium). Os resultados mostraram que nas concentrações de 300, 600, 800 e 1600µg/mL de miltefosina houve aumento no percentual de redução do MTT pelos macrófagos peritoneais (p<0,05, teste t pareado), significando um aumento da atividade mitocondrial. Estão representados as médias e os desvios padrão. Os valores percentuais apresentados foram calculados a partir das absorbâncias lidas pelo espectrofotômetro, tendo como parâmetro o grupo não exposto à miltefosina (controle), para o qual se atribuiu 100% de redução do MTT..... 36
- Figura 5.** (A) Índice fagocitário (IF), (B) percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (%MEF) e (C) média de leveduras fagocitadas (MLF) por macrófagos peritoneais coletados de camundongos C57BL/6 normais (n= 9) e incubados por 30 min com miltefosina (0, 10, 50, 100µg/mL) e com 4×10^6 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), na presença de soro fetal bovino. A miltefosina afetou a fagocitose por receptores para os padrões moleculares de patógenos, em relação ao controle, nas preparações incubadas com 50µg/mL, pois aumentou a mediana do índice fagocitário (p<0,001, teste de Wilcoxon) e a mediana do percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (p<0,001, teste de Wilcoxon), embora tenha diminuído a mediana de leveduras fagocitadas (p=0,004, teste de Wilcoxon). Estão representados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos..... 38
- Figura 6.** Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 na ausência de miltefosina (A1) e incubados com 10µg/mL de miltefosina (A2), na presença de soro fetal bovino..... 39
- Figura 7.** Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 incubados com 50µg/mL de miltefosina (A1) e com 100µg/mL da droga (A2), na presença de soro fetal bovino..... 39
- Figura 8.** (A) Índice fagocitário (IF), (B) percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (%MEF) e (C) média de leveduras fagocitadas (MLF) por macrófagos peritoneais coletados de camundongos C57BL/6 normais (n= 9) e incubados por 30 min com miltefosina (0, 10, 50, 100µg/mL) e com 4×10^6 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), na presença de pool de soro dos camundongos. Houve, em relação ao

controle, aumento do índice fagocitário com 10µg/mL (p=0,001, teste de Wilcoxon) ou 50µg/mL (p<0,001, teste de Wilcoxon), aumento no percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose com 10µg/mL (p=0,023, teste de Wilcoxon) ou com 50µg/mL (p=0,002, teste de Wilcoxon) e na mediana de leveduras fagocitadas com 10µg/mL e com 50µg/mL de miltefosina (p=0,004, teste de Wilcoxon). Estão representados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos..... 41

Figura 9. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 na ausência de miltefosina (**A1**) e incubados com 10µg/mL da droga (**A2**), na presença de soro fresco dos camundongos..... 42

Figura 10. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 incubados com 50µg/mL (**A1**) e com 100µg/mL (**A2**) de miltefosina, na presença de soro fresco dos camundongos..... 42

Figura 11. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 (n= 10) expostos a diferentes concentrações de miltefosina (0, 10, 50 e 100µg/mL), quando não estimulados (**A**) ou estimulados com LPS (**B**) ou estimulados com INF-γ (**C**) ou com ambos LPS e INF-γ (**D**). Houve diferença estatística nas médias ± DP da produção de NO basal, NO estimulado com LPS, NO estimulado com INF-γ e NO estimulado com LPS e INF-γ (p< 0,001, ANOVA). A miltefosina promoveu, nas três dosagens testadas (10, 50 e 100µg/mL), uma queda significativa na produção de óxido nítrico em relação ao controle; não havendo diferença nas médias ± DP entre os grupos de doses estudadas (p<0,001, teste de Student-Newman-Keuls). Estão representados as médias e desvios padrão..... 44

Figura 12. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (n= 10) incubados com diferentes concentrações de miltefosina (10, 50 e 100µg/mL, quando não estimulados (**A**) ou estimulados com 20nM de PMA (**B**) ou estimulados com 100nM de PMA (**C**). Os resultados mostraram que nenhuma das doses testadas de miltefosina alterou a produção basal de peróxido de hidrogênio (p>0,05, teste t pareado) (A). Em B e C, não houve diferença estatística nas médias ± DP de produção de H₂O₂ entre os grupos de diferentes doses testadas nas escavações estimuladas com 20nM ou com 100nM de PMA (p>0,05, teste de Student-Newman-Keuls), portanto não houve alteração na produção de peróxido. Estão representados as médias e desvios padrão..... 46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeito da miltefosina sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 após a incubação por 4 horas na presença de MTT..... 79
- Tabela 2.** Efeito da miltefosina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 incubados com 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* na presença de soro fetal bovino inativado..... 79
- Tabela 3.** Efeito da miltefosina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 incubados com 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas com soro fresco dos camundongos..... 81
- Tabela 4.** Efeito da miltefosina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6. Produção basal (A), após estímulo com LPS (B), LPS + INF- γ (C), INF- γ (D)..... 82
- Tabela 5.** Efeito da miltefosina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6. Produção basal (A), após estímulo com 20nM de PMA (B), 100nM de PMA (C)..... 83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABL – Anfotericina B lipossomal
APC - célula apresentadora de antígenos
APLs - alquilfosfolipídios
°C - grau Celsius
Cl₅₀ - concentração inibitória da droga que induz 50% de lise ou morte celular
CO₂ - dióxido de carbono
cm - centímetro
CR - receptor de complemento
CRI - receptor de complemento tipo I
DNA - ácido desoxirribonucléico
DP - Desvio padrão
FcγRI - Receptor Fc para imunoglobulina G do tipo I (CD64)
Fc - Fração cristalizável de imunoglobulinas
g - grama
gp63 - glicoproteína de peso molecular de 63 kDa
GPI - glicosilfosfatidilinositol
HPC - hexadecilfosfocolina
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
IF - índice fagocitário
IFN - interferon
IgA - Imunoglobulina A
IgE - Imunoglobulina E
IgG - Imunoglobulina G
IL - interleucina
kg - quilograma
l - litro
LDL - lipoproteína de baixa densidade
LdMT - Leishmania donovani Miltefosine Transporter
LV - Leishmaniose visceral
LT - Leishmaniose tegumentar
LC - Leishmaniose cutânea
LM - Leishmaniose mucosa
LPA - lisofosfolipídio
LPG – lipofosfoglicano
LV – Leishmaniose visceral
mL - mililitro
μM - micromoles
M - molar
MEF - macrófagos envolvidos na fagocitose
MLF - média de leveduras fagocitadas
mg - miligrama
MHC - complexo maior de histocompatibilidade
min - minuto

mm - milímetro
MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium
N – normal
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato redutase
NaOH – Hidróxido de sódio
NBT – nitroblue tetrazólio
ng - nanograma
NK - natural killer
nM - nanomoles
NO - óxido nítrico
NOS - óxido nítrico sintase
iNOS- óxido nítrico sintase induzida
cNOS - óxido nítrico sintase constitutiva
OMS - Organização Mundial da Saúde
PC - fosfatidilcolina
pH - potencial hidrogeniônico
PKC - proteína cinase C
PLC - fosfolipase C
PMA - acetato forbol miristato
ROIs - intermediário reativo de oxigênio
ROS - espécies reativas de oxigênio
rPMP - receptores para os padrões moleculares de patógenos
SbV - Antimoniais pentavalentes
SDS - Dodecil sulfato de sódio
STF - solução tamponada fosfatada
TGF - fator de crescimento e transformação
Th1 – Resposta celular do tipo 1
Th2 - Resposta celular do tipo 1
TNF - fator de necrose tumoral
TLR - receptores semelhantes ao Toll
xg - força gravitacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Miltefosina.....	25
3.2	Animais.....	26
3.3	Obtenção de células peritoneais dos camundongos C57BL/6.....	26
3.4	Efeito da miltefosina sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais dos camundongos.....	27
3.5	Efeito da miltefosina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos.....	29
3.6	Efeito da miltefosina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos.....	31
3.7	Efeito da miltefosina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos.....	32
3.8	Testes estatísticos.....	33
4	RESULTADOS.....	35
4.1	Efeito da miltefosina sobre a viabilidade das células peritoneais de camundongos C57BL/6.....	35
4.2	Efeito da miltefosina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.....	36
4.3	Efeito da miltefosina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6	43
4.4	Efeito da miltefosina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.....	45
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES.....	57
7	PERSPECTIVAS.....	59
8	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO A- Parecer do Comitê de ética.....	73

ANEXO B- Soluções e reagentes.....	75
ANEXO C- Planilhas e Tabelas.....	78
ANEXO D- Artigo enviado à revista Acta tropica.....	85

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (1). Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas, em 88 países, estão em áreas de risco. As leishmanioses atingem cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Há dois milhões de novos casos anuais, sendo 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral (2,3).

A leishmaniose é uma doença endêmica presente em todas as unidades federativas do Brasil, com magnitudes distintas em diferentes locais quanto às espécies de leishmânias e vetores envolvidos, além de diversos determinantes ambientais, sócio-econômicos e políticos (1). De acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (4), no ano de 2009 foram registrados 21.824 casos de leishmaniose tegumentar e 3.693 casos de leishmaniose visceral no Brasil (5).

A doença é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que implicará em diferentes manifestações clínicas (2,6). As principais espécies responsáveis pela LT no Brasil são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (L.) amazonensis*. É, primariamente, uma zoonose, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente (6). Enquanto que as espécies associadas à leishmaniose visceral (LV) são: *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum* no Velho Mundo e *Leishmania (L.) chagasi* no Novo Mundo (7).

A forma de transmissão da doença é indireta, através da picada de um inseto hematófago, denominado flebotomíneo, pertencente à Ordem *Díptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LT são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (6). E a espécie *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da LV no Brasil (7).

Quando o flebotomíneo, em repasto sanguíneo, pica o indivíduo parasitado, retira junto com o sangue macrófagos infectados que se rompem dentro do intestino do inseto e liberam formas amastigotas. Nesse ambiente, estas formas se diferenciam em promastigotas, que são formas flageladas. Nesta fase, o parasito desenvolve uma série de modificações morfológicas se diferenciando em promastigota procíclico, encontrado nas paredes do trato alimentar do flebótomo e multiplica-se extracelularmente por divisão binária. A partir daí, o parasito passa para o estágio promastigota metacíclico, que são formas infectantes, capazes de migrar para o intestino anterior do inseto de modo que ele possa ser transmitido no repasto sanguíneo subsequente (6,8,9).

Classicamente a doença se manifesta sob as seguintes formas: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa e a leishmaniose visceral. A úlcera típica de leishmaniose cutânea (LC) é indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele; com formato arredondado ou ovalado; mede de alguns milímetros até alguns centímetros; base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem-delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e com granulações grosseiras (1). Há também a forma cutânea disseminada, causada pelas espécies *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis*, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com freqüência a face e o tronco (6).

A leishmaniose mucosa (LM) se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores e é causada pela *L. braziliensis*. A forma clássica de LM é secundária à lesão cutânea de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática (1).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, compromete células do sistema fagocítico mononuclear, concentrando-se no baço, fígado e medula óssea. As principais manifestações clínicas são: febre, anorexia, perda ponderal, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia e em alguns casos linfadenopatia (10).

A resposta imunitária do hospedeiro interfere na evolução da infecção, desde o início à resolução do processo patológico. A resposta celular inicia-se com a

atuação das células apresentadoras de antígeno, que são os macrófagos. Estas células se originam a partir dos monócitos que migram da corrente sanguínea para diferentes tecidos e integram o sistema de fagócitos profissionais do organismo, capazes de internalizar e matar microorganismos invasores em compartimentos lisossomais (11).

Os macrófagos são células efetoras importantes na imunidade natural realizando a fagocitose e produzindo citocinas que recrutam e ativam células inflamatórias (12). O mecanismo de fagocitose consiste de várias etapas: adesão, endocitose ou engolfamento, morte intracelular, digestão e, no caso dos macrófagos, apresentação de peptídeos (oriundos da digestão da partícula estranha) na membrana (13).

Os neutrófilos e macrófagos expressam receptores de superfície que se ligam a microorganismos e medeiam a sua internalização. Há receptores para padrões moleculares de patógenos tais como receptores de manose e glicana e receptores de limpeza (*scavenger*); e há receptores para opsoninas tais como receptores para a fração cristalizável das imunoglobulinas, especialmente a IgG, receptores para as frações do sistema complemento, proteína amilóide A e lectina de ligação à manose (12,14).

O receptor de manose é uma lectina do macrófago que se liga a resíduos terminais de manose e de fucose em glicoproteínas e glicolipídios. Esses açúcares são tipicamente parte das moléculas encontradas em paredes celulares microbianas, ao passo que as glicoproteínas e os glicolipídios de mamíferos contêm resíduos terminais de ácido siálico ou N-acetilgalactosamina. Portanto, os receptores de manose do macrófago reconhecem microorganismos e não células do hospedeiro (12).

Os receptores *scavenger* foram originalmente definidos como moléculas que se ligam e medeiam a endocitose de partícula de lipoproteína de baixa densidade (LDL), oxidadas ou acetiladas, que não podem mais interagir com o receptor de LDL convencional. Os receptores *scavenger* dos macrófagos se ligam a uma variedade de microorganismos bem como às partículas modificadas de LDL (12).

Por outro lado, os receptores para opsoninas promovem a fagocitose de microorganismos recobertos por várias proteínas, incluindo anticorpos, proteínas do

complemento e lectinas, após processo de opsonização (12). Um dos sistemas mais eficientes para opsonizar partículas é a cobertura destas com anticorpos IgG, os quais são denominados opsoninas específicas e são reconhecidos pelo receptor Fcγ de alta afinidade do fagócito, denominado FcγRI.

Componentes do sistema complemento, especialmente fragmentos da proteína C3, também são opsoninas potentes, porque os fagócitos expressam receptores como o CR1 e o CR3, que reconhecem o produto de degradação do C3. Estes fragmentos do complemento são produzidos quando ocorre ativação pela via clássica (dependente de anticorpo), como pela via alternativa (não dependente de anticorpo) (12).

Quanto à ligação da leishmânia à superfície da membrana plasmática dos macrófagos, esta pode ocorrer por numerosos receptores que medeiam a fagocitose, os quais incluem o receptor FcR, receptores de complemento CR1 e CR3, além dos receptores de carboidratos tais como receptores de manose de macrófagos (15).

Concomitantemente à aderência e fagocitose, inicia-se uma série de eventos bioquímicos e moleculares, com a ativação da enzima NADPH oxidase, que transfere prótons para moléculas de oxigênio, formando superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, todos altamente reativos. Os macrófagos também são capazes de ativar próton ATPases e assim alterar o pH das vesículas fagocíticas formadas, tornando-as extremamente ácidas o que leva à desnaturação das proteínas, deixando suscetíveis à ação de hidrolases (16).

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é um intermediário reativo de oxigênio (ROIs), que se juntará com outros produtos gerados no processo de explosão oxidativa, a fim de oxidar as membranas celulares dos microorganismos, formando pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais, o que leva à morte dos agentes patogênicos (17).

A exposição de formas promastigotas de *L. donovani* ao H₂O₂ causa várias alterações no parasito, como condensação nuclear, acúmulo de cálcio intracelular, ativação da via das caspases, fragmentação do DNA celular e perda de volume celular. Além disso, altas concentrações de H₂O₂ aumentam a perda da motilidade assim como a morte celular (18).

Além dos ROIs, os macrófagos produzem intermediários reativos de nitrogênio, principalmente o óxido nítrico. Este radical é um gás inorgânico, derivado do aminoácido L-arginina pela atividade enzimática de três dioxigenases, denominadas óxido nítrico sintases (NOS), sendo duas constitutivas em determinadas células e uma induzível, recebendo as siglas respectivas de cNOS e iNOS. As formas constitutivas estão presentes no endotélio vascular e sistema nervoso central. Enquanto que as formas induzidas são produzidas por fagócitos quando estes são estimulados por produtos microbianos como os lipopolissacarídeos (LPS) e/ou citocinas, como IFN- γ , TNF- α e IL-1 (19,20). O NO faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo, pois possui poder antibactericida, antiparasitário e antiviral, sendo tóxico aos microorganismos invasores (19).

Modelos experimentais em ensaios com leishmânia comprovaram que macrófagos peritoneais de camundongos estimulados *in vitro* com interferon-gama (IFN- γ), em presença de LPS, liberam grandes quantidades de NO e destroem o parasito eficientemente. Além disso, formas promastigotas de *L. major* são destruídas quando incubadas na presença de doador de NO, S-Nitroso-N-Acetil-D, L-penicilamina – SNAP (21). Durante a infecção por *L. major*, o NO se mostrou importante para a regulação das células *Natural Killer* (NK) na imunidade inata, pois é um co-fator para reações que culminam na produção de IL-12, uma das citocinas determinantes para o estímulo da resposta adaptativa curativa (22). *In vivo*, várias evidências correlacionam a produção de NO com o controle da infecção (21,23,24).

Além dos mecanismos microbicidas deflagrados naturalmente pelo sistema imunológico do hospedeiro, há necessidade de uma terapêutica medicamentosa que impeça a progressão da doença e promova a cura. No Brasil, como também em muitos países em que a leishmaniose é endêmica, os antimoniais pentavalentes (SbV) constituem a droga de primeira escolha para o tratamento desta doença há, aproximadamente, 60 anos (6,25,26). Porém esses medicamentos são responsáveis por diversos efeitos colaterais, como artralgia, mialgia, inapetência, náusea, epigastralgia, pirose, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, choque pirogênico, edema, hepatite com aumento de transaminases e fosfatase alcalina, insuficiência renal aguda, pancreatite e alterações dose-dependentes do eletrocardiograma. Sendo, portanto, contra-indicado o uso desses antimoniais em cardiopatas,

nefropatas e hepatopatas (2,27,28,29). Embora raros, existem relatos de morte súbita desencadeada pela cardiotoxicidade dos antimoniais (30).

Além disso, estudos recentes demonstram um aumento de casos documentados resistentes ao tratamento com os antimoniais, demonstrando que sua eficácia não é previsível (2,3,25,26). A resposta de pacientes ao tratamento com antimoniais pode variar de acordo com fatores como a espécie da leishmânia, o estado imunológico do paciente, a forma clínica e a ocorrência de co-infecção (2,28,29).

Existe também um tratamento de segunda linha com as drogas pentamidina e anfotericina B, recomendado em caso de contra-indicações, intolerância e resistência aos antimoniais (6). Porém estas drogas de segunda linha também apresentam toxicidade e, para minimizar os efeitos colaterais, foram desenvolvidas formas lipídicas da anfotericina B. A anfotericina B lipossomal (ABL) é menos tóxica que a anfotericina B clássica e é uma boa alternativa ao tratamento das leishmanioses resistente aos antimoniais (31). Em estudo realizado no Brasil a ABL foi usada com segurança e boa eficácia no tratamento da forma mucosa de leishmaniose, causada por *Leishmania (V.) braziliensis* (32). Entretanto, esta droga apresenta um elevado custo que limita a sua utilização nos serviços públicos de saúde de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (31). Outras drogas também são empregadas, porém muitas apresentam toxicidade, manifestam resistência e podem não curar.

No Brasil, os percentuais de cura e abandono do tratamento da LT em 2006 atingem 75,5% e 3,1%, respectivamente (1,29,33). Para melhorar esses indicadores, há um grande interesse e necessidade de estudar e testar novas terapias.

Nesse contexto, a miltefosina (hexadecilfosfocolina) surgiu como uma droga promissora para o tratamento da doença. Trata-se de uma alquilfosfocolina com propriedades antimetastáticas, desenvolvida originalmente para o tratamento de carcinomas mamários (34,35,36). Estudos posteriores mostraram que a mesma é ativa contra *Leishmania spp*, *in vitro* e *in vivo* (37,38,39,40,41), e pode vir a ser o primeiro tratamento oral para a leishmaniose visceral (42,43,44).

A miltefosina tem apresentado alta eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea no Novo e Velho Mundo (41,45,46,47), mucocutânea (48) e leishmaniose visceral (38,49,50).

O mecanismo de ação da miltefosina contra a leishmânia ainda não é bem entendido (51,52). Sabe-se que esta droga exerce efeitos tóxicos diretos sobre os parasitos (53). É capaz de alterar a composição da membrana, interfere no metabolismo dos fosfolipídios e na biosíntese de glicoproteínas (54,55); podendo acarretar morte da leishmânia por apoptose (56).

Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostraram a eficácia deste fármaco para o tratamento de infecções por *L. donovani* (37,53,57,58). Porém nem todas as subespécies do parasito leishmânia têm a mesma sensibilidade à miltefosina (44). Em estudo experimental realizado no Brasil que investigou a ação leishmanicida da miltefosina em formas promastigotas de leishmânia, observou-se que a espécie mais sensível à droga foi a *L. amazonensis*, seguida pela *L. braziliensis* e a menos sensível foi a *L. guyanensis* (40).

Estudos vêm sendo realizados para uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência da leishmânia à miltefosina. Ensaio *in vitro* com formas promastigotas de leishmânia identificaram a presença de um transportador de membrana que medeia a internalização do fármaco para o interior do parasito, denominado LdMT (Leishmania donovani Miltefosine Transporter) que se localiza na membrana plasmática do parasito e também é responsável pelo transporte de fosfolipídeos para o interior da célula. Mutações de dois alelos deste transportador (LdMT) parecem reduzir a captação do medicamento no interior da célula, constituindo um importante mecanismo de resistência do parasito (59,60,61).

Desde 2002, o fármaco tem registro na Índia e vem sendo utilizado para o tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com antimoniais, apresentando resultados bastante promissores com taxas de cura acima de 91% quando utilizada a dose de 2,5mg/kg/dia durante 28 dias (43,62,63). A prática clínica tem demonstrado que doses diárias superiores a 150mg podem causar sérios efeitos adversos gastrintestinais (44). Em 2005, a miltefosina foi registrada também na Colômbia para tratamento da leishmaniose cutânea (63,64) e mais recentemente na Bolívia (65).

No Brasil, a droga tem sido amplamente estudada por pesquisadores da Universidade de Brasília. Sampaio e colaboradores foram os pioneiros em pesquisas experimentais *in vivo* em camundongos para avaliação da eficácia da miltefosina no tratamento da LT causada principalmente pela *L. amazonensis* (40,66). Também obtiveram bons resultados clínicos com o primeiro relato brasileiro de tratamento da forma mucosa de LT refratária utilizando a miltefosina (67).

Quanto à farmacocinética da droga, tem sido demonstrado que a miltefosina atravessa o epitélio gastrointestinal mediante um transporte paracelular, completamente passivo (68). A concentração máxima do fármaco no sangue é inferior a 70µg/mL em adultos e 24µg/mL em crianças (65). É detectada pela primeira vez no plasma 6 horas após a sua administração e é eliminada do corpo muito lentamente, sendo a meia vida inicial de eliminação de 7,05 dias e final de umas 4 semanas (44). Mas, a miltefosina pode ainda ser detectada no plasma humano até 5 a 6 meses após o tratamento, o que leva ao risco de o parasito desenvolver resistência ao fármaco.

Quanto aos efeitos colaterais, o trato gastrointestinal apresenta-se como órgão alvo, podendo causar náuseas, vômitos e diarreia; além de poder aumentar os níveis sanguíneos de transaminases, de uréia e de creatinina (63,69). Também já foi comprovado que a miltefosina é uma droga potencialmente teratogênica, induzindo o aborto em animais (63), por isso recomenda-se que pacientes em idade reprodutiva façam uso de anticoncepcional durante o tratamento com miltefosina e, no mínimo, por mais seis meses após o término do mesmo (70). Mas ainda há questões não bem esclarecidas.

Apesar disso, a miltefosina oral é uma grande esperança no tratamento da leishmaniose. Vários benefícios podem ser descritos, como: a diminuição da necessidade de hospitalização em casos de leishmaniose visceral, redução do desconforto das injeções, melhora da qualidade de vida do paciente, diminuição dos custos e da demanda por serviços nas unidades de saúde (63); mas também há necessidade de comprometimento do paciente na ingestão da dose diária e adesão ao tratamento, para que seja possível a eficácia terapêutica.

Em relação à modulação do sistema imune, alguns estudos sugerem que este fármaco possui ação imunomodulatória, ativando macrófagos (71,72), interferindo na fagocitose (34), no estresse oxidativo e na produção de citocinas em

camundongos BALB/c (73,74). No entanto, em células dendríticas de camundongos C57BL/6 infectadas por *Leishmania major*, a miltefosina não alterou a produção de citocinas TNF- α , IL-12 p40, IL-12 p70 e IL-10, nem a produção de óxido nítrico (53). Também foi demonstrado que, mesmo em camundongos imunodeficientes, este fármaco apresenta atividade antitumoral (75) e leishmanicida (76), sugerindo que sua atividade não está relacionada com uma resposta imune dependente de células T (75,76).

Contudo, a maior parte dos estudos verificam a ação da miltefosina diante de células infectadas por leishmânia ou pesquisam a toxicidade da droga em células tumorais; não dando tanta ênfase à avaliação do fármaco diante de células livres de infecção.

Diante da importância de conhecer o efeito das drogas sobre a funcionalidade das células, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito, *in vitro*, da miltefosina sobre a viabilidade e as funções dos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da miltefosina sobre macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6 em ensaio *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da miltefosina sobre a viabilidade das células peritoneais dos camundongos da linhagem C57BL/6 em ensaio *in vitro*;
- Avaliar o efeito da miltefosina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais dos camundongos da linhagem C57BL/6 em ensaio *in vitro*;
- Avaliar o efeito da miltefosina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais dos camundongos da linhagem C57BL/6 em ensaio *in vitro*;
- Avaliar o efeito da miltefosina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais dos camundongos da linhagem C57BL/6 em ensaio *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo do tipo experimental *in vitro* realizado a partir de cultura de células. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular e no Laboratório de Dermatologicologia, ambos pertencentes à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

3.1 Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) (Figura 1) utilizada neste estudo foi doada pela Indústria Farmacêutica Zentaris GmbH (Alemanha) ao Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, para fins de estudos, não havendo conflitos de interesse. Trata-se de uma alquilfosfatidilcolina desenvolvida como agente antitumoral, que atua inibindo a transdução de sinais de enzimas, a biosíntese de fosfolipídios e esteróis (64,77,78). Possui peso molecular de 407,57 (79) e é solúvel em água (61).

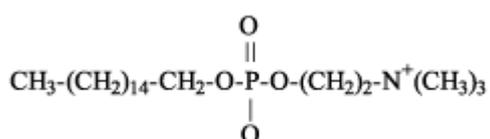


Figura 1: Estrutura química da hexadecilfosfocolina (miltefosina) (42).

Para os ensaios de viabilidade e fagocitose foi utilizada a miltefosina em cápsulas; porém, posteriormente, foi-nos cedida a miltefosina em pó e a utilizamos para os demais ensaios. Esta mudança teve como objetivo evitar possíveis interferências dos constituintes do veículo das cápsulas na leitura das absorvâncias realizada pelo espectrofotômetro.

Para os ensaios que avaliaram o efeito da miltefosina sobre a viabilidade das células peritoneais dos camundongos, procedeu-se diluições seriadas a partir das dosagens de 1200 e 1600µg/mL. Para os ensaios imunológicos, os macrófagos foram expostos a três diferentes concentrações da miltefosina (10, 50 e 100µg/mL).

A escolha destas concentrações baseou-se em estudo farmacocinético da droga em pacientes com leishmaniose cutânea, no qual foi determinada a concentração plasmática máxima desta droga que é de 51,6µg/mL (44). Então, utilizou-se uma dose em torno do pico sérico e outras duas intermediárias.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, com idade de 8 a 10 semanas e peso de aproximadamente 30g, provenientes do Alojamento de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Trata-se de uma linhagem resistente à infecção por leishmânia e que representa bem a leishmaniose cutânea com padrão de resposta imunológica celular Th1 (80). Os números de camundongos empregados em cada grupo experimental foram os seguintes:

- Ensaios de viabilidade das células peritoneais: n= 9 camundongos.
- Ensaios de fagocitose: n= 9 camundongos.
- Ensaios de óxido nítrico: n= 10 camundongos.
- Ensaios de peróxido de hidrogênio: n= 10 camundongos.

Durante o período do experimento os animais foram mantidos em ambiente controlado, com ciclo claro/ escuro de 12/12 horas, recebendo água potável e ração à vontade.

3.3 Obtenção das células peritoneais dos camundongos C57/BL6

Os camundongos foram devidamente anestesiados por inalação de éter etílico em câmara especial e, posteriormente, sacrificados por deslocamento cervical. Este procedimento foi realizado por profissional devidamente capacitado no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, conforme preconiza a Resolução nº714 de 21 de junho de 2002 (81). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética no uso animal da Universidade de Brasília em processo sob nº: 11254/2010 (Anexo A).

As células peritoneais foram obtidas através de uma pequena incisão central, de aproximadamente 0,5cm, no abdômen dos camundongos. Foi injetada intraperitonealmente 10mL da solução tamponada fosfatada (STF), pH 7,2, 0,15 M, estéril, 4°C. As cavidades abdominais foram suavemente massageadas a fim de distribuir homogeneamente o tampão por todo o peritônio e a suspensão celular foi coletada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferida para um tubo Falcon.

O material obtido foi centrifugado durante 10 minutos a 400xg, em centrífuga resfriada a 4°C. O sobrenadante das células foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e, em seguida, as células foram quantificadas e a viabilidade avaliada em câmara de Neubauer (Figura 2), utilizando solução de nigrosina 0,05%, na proporção de 1:5 (40µL da suspensão de células em 160µL nigrosina, volume final de 200µL). Após isto, as células foram novamente suspensas em RPMI 1640, pH 7,2, para serem utilizadas nos vários testes funcionais. A viabilidade das células foi sempre superior a 97%.

As suspensões de células foram mantidas sob refrigeração em tubos plásticos graduados de 15mL (LabTech, Melbourn, Inglaterra), desde a sua coleta até o início dos experimentos.

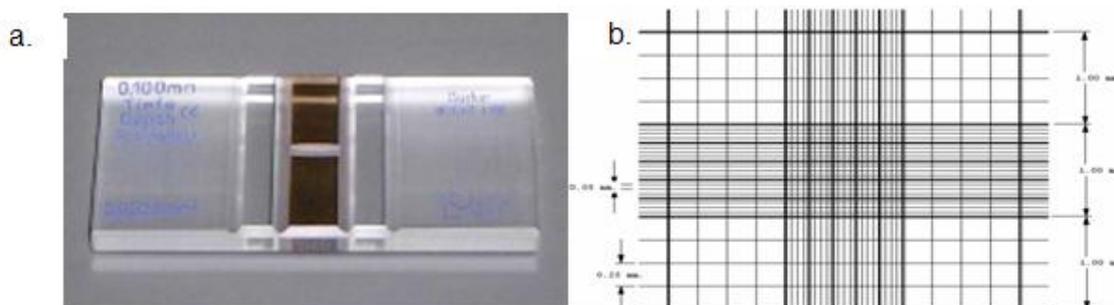


Figura 2: Câmara de Neubauer (a.); quadrantes da câmara de Neubauer (b.)

3.4 Efeito da miltefosina sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6

Para avaliar ação da miltefosina sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais foi empregado o método colorimétrico (82), que utiliza o sal 3-(4,5-

dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium (MTT). Este método avalia indiretamente a viabilidade celular pela atividade da enzima succinato-desidrogenase presente nas mitocôndrias. Isso é possível porque o MTT é um sal tetrazólico de cor amarelo ouro, que quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado pelas enzimas mitocondriais formando cristais de formazan, insolúveis e de cor púrpura, que se acumula nas células devido a sua incapacidade de atravessar a membrana celular. A quantidade de formazan produzida é, por conseguinte, diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes em cada poço, ao qual foi adicionado o MTT (83,84,85).

Foram coletadas células peritoneais de nove camundongos C57BL/6 e a suspensão das células foi quantificada de acordo com o descrito no item 3.3 e foram preparadas novas suspensões em meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino, contendo 2×10^5 células em 100 μ L de meio. Também foram preparadas as soluções contendo a miltefosina em diferentes concentrações obtidas por diluição seriada, ora partindo-se de 1600 μ g/mL, ora de 1200 μ g/mL, em meio RPMI 1640 sem soro. Os experimentos foram organizados em 3 etapas, cada uma com grupos de 3 camundongos sendo avaliados em momentos independentes, porém mantidas as mesmas condições.

Foram preparadas duplicatas em placa de microcultivo contendo 96 poços (LabTech, Melbourn, Inglaterra). Inicialmente, todas as escavações-teste receberam 2×10^5 células em volume de 100 μ L de meio RPMI 1640. Em seguida, foram adicionados 100 μ L das soluções contendo as diferentes concentrações da miltefosina. Nas escavações para o controle foram adicionados meio RPMI sem soro à suspensão de células, para completar o volume final de 200 μ L. Posteriormente, as células foram incubadas em estufa úmida por 1 hora a 37°C com 5% de CO₂ no ar.

Após esse período foram adicionados a cada poço 10 μ L de uma solução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium (MTT) a 5mg/mL. Após a adição do MTT, a placa de cultura foi incubada por mais 4 horas a 37°C. Decorrido este período, foram adicionados 50 μ L SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 10% para solubilização dos cristais de formazan formados na etapa anterior e para melhorar o espectro de absorbância da solução. Posteriormente, foi possível realizar a leitura da placa em espectrofotômetro (SpectraMax® Plus384 microplate reader) a 570 nm (Figura 3). Os resultados foram expressos em percentual de redução do

MTT pelas células peritoneais, que foram calculados a partir das absorvâncias lidas pelo espectrofotômetro, tendo como parâmetro o grupo não exposto à miltefosina, para o qual se atribuiu 100% de redução do MTT. Foram plotados no gráfico somente os resultados mais significativos, incluindo as dosagens 0; 12,5; 25; 50; 150; 300; 600; 800 e 1600µg/mL de miltefosina.

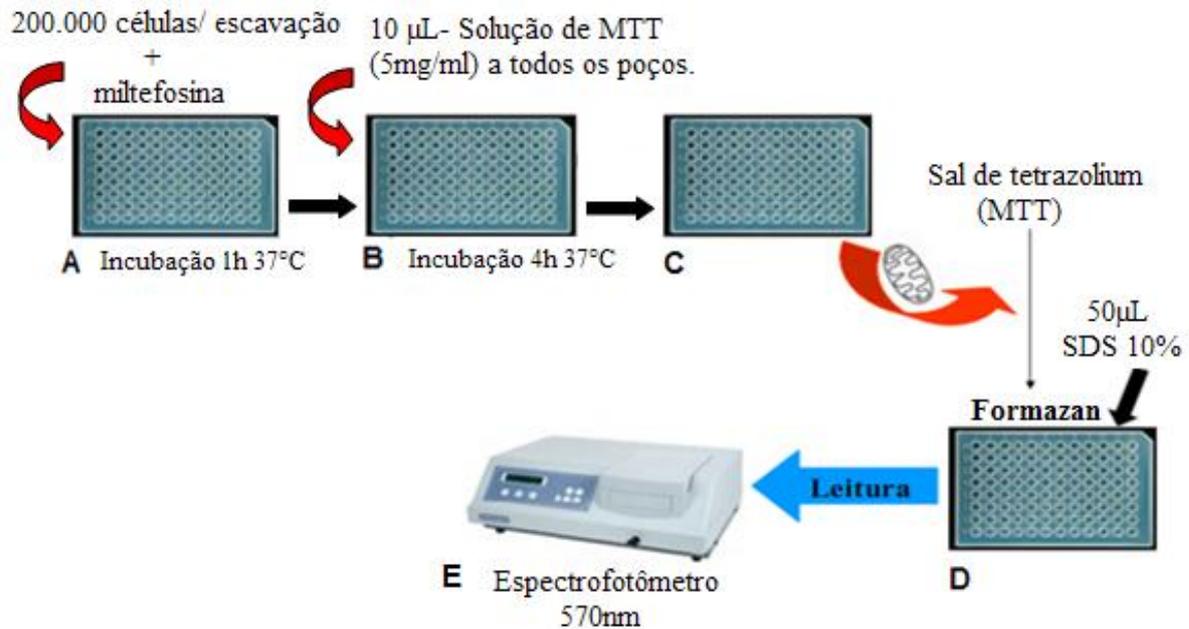


Figura 3: Esquema da técnica utilizando o MTT. Foram incubadas 2×10^5 células/escavação com diferentes concentrações da miltefosina por 1 hora a 37°C em câmara contendo CO₂ (A). Após este período, foram adicionados 10µL de MTT a todos os poços (B) e a placa foi novamente incubada por 4 h a 37°C (C). Em seguida, adicionou-se 50µL de SDS a 10% a todos os poços para solubilização dos cristais de formazan (D). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm (E). Esquema adaptado (86).

3.5 Efeito da miltefosina sobre a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6

Para avaliar o efeito das diferentes concentrações de miltefosina sobre a fagocitose por macrófagos peritoneais foram coletadas individualmente células de nove camundongos C57BL/6. Além das células, coletou-se também sangue dos camundongos por punção cardíaca, que foi centrifugado. O plasma murino a 10% foi utilizado como fonte de complemento para sensibilização das leveduras.

Os experimentos foram organizados em 2 etapas, uma com grupo de 5 camundongos e outra com 4, sendo avaliados em momentos independentes, porém mantidas as mesmas condições. Cada experimento foi realizado em placa de microcultivo de fundo plano e com 24 escavações, onde foram previamente depositadas lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro. Foram distribuídas 2×10^5 células em volume de 500 μ L de meio RPMI 1640 sem soro em todas as escavações da placa, e em seguida foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 2 horas, com 5% de CO₂ no ar, para a aderência dos macrófagos. Em seguida, as escavações foram lavadas três vezes com STF, pH 7,2 a 37°C, para retirar as células não aderidas.

Na próxima etapa, foram preparadas as diferentes concentrações da miltefosina (0, 10, 50 e 100 μ g/mL) e a suspensão de leveduras contendo 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, previamente sensibilizadas com o *pool* de soro dos camundongos ou apenas com soro fetal bovino inativado; de modo que o volume final de cada escavação foi de 500 μ L. As placas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C em atmosfera de ar com 5% de CO₂.

Em seguida, as escavações foram lavadas com STF aquecido a 37°C (0,15M, pH 7,2), para retirar as leveduras não fagocitadas. A última lavagem foi feita com RPMI 1640, pH 7,2, contendo 30% de SFB para melhor preservar as preparações. Posteriormente, as lamínulas foram secas, fixadas com metanol absoluto por 1 minuto e coradas com Giemsa a 10% em tampão de coloração por 10 minutos. Depois cada escavação foi lavada três vezes com tampão de coloração e as lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia com entellan (Merk, Alemanha).

Para estimar o índice fagocitário, 200 macrófagos foram contados em microscópio óptico sob aumento de 100x, em óleo de imersão. O cálculo foi feito multiplicando o percentual de macrófagos envolvidos com a fagocitose pela média de leveduras fagocitadas (87,88,89).

3.6 Efeito da miltefosina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6

O óxido nítrico é um produto da oxidação da L-arginina em citrulina e sendo uma molécula instável rapidamente decompõe-se em nitrito e nitrato. Então, para avaliar a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos peritoneais foi utilizada a reação de Griess, para a quantificação do nitrito no sobrenadante das culturas de células (90).

O princípio da reação de Griess baseia-se na reação do nitrito com uma amina primária aromática em meio ácido para formar um sal de diazônio, que por sua vez reage com um composto aromático formando um azo composto violeta que pode ser lido colorimetricamente (91).

As células peritoneais foram coletadas de dez camundongos normais, centrifugadas a 4°C a 400xg, durante 10 minutos e quantificadas em câmara de Neubauer. Posteriormente, alíquotas de 2×10^5 células/ 200µL de RPMI 1640 sem soro fetal bovino foram distribuídas em triplicatas em placa de microcultivo com 96 poços (LabTech, Melbourn, Inglaterra). Os experimentos foram organizados em 2 etapas, cada uma com grupo de 5 camundongos sendo avaliados em momentos independentes, porém mantidas as mesmas condições.

Após incubação em estufa a 37°C, durante 2 horas, em câmara com 5% de CO₂ no ar, as escavações foram lavadas uma vez com STF (0,15 M, pH 7,2) a 37°C, para retirar as células não aderidas. Em seguida, foram incubadas por 24h, com a miltefosina nas concentrações (0, 10, 50 e 100µg/mL). Além da droga, algumas escavações foram estimuladas com 50ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) ou com 50ng/mL de INF-γ (Sigma, EUA) ou com ambos, em volume final de 200µL completados com RPMI 1640, pH 7,2 a 37°C, com 10% de soro fetal bovino.

Decorrido este período, foram transferidos 100µL do sobrenadante de cada escavação para outra placa de 96 poços e adicionados 100µL do reagente de Griess (sulfanilamida 2% em solução de ácido fosfórico 5% e N-1 naphylethylenediamine dihydrochloride 0,1%) a todas as escavações. O grupo-

controle negativo constou de suspensão celular em solução de RPMI 1640 com 10% de soro.

A curva padrão para a determinação do óxido nítrico foi preparada a partir da diluição seriada de uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) 200mM nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128, que correspondem respectivamente a sete diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 μM), em água destilada. O padrão 0 μM foi preparado apenas com água destilada.

As leituras das reações foram feitas em espectrofotômetro (SpectraMax® Plus384 microplate reader) em comprimento de onda de 540nm e os resultados expressos em micromoles (μM) de NO_2^- (89).

3.7 Efeito da miltefosina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6

A produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos foi avaliada pela técnica que se fundamenta na oxidação da fenolsulftaleína (vermelho de fenol) pela peroxidase na presença de H_2O_2 formando um produto que pode ser lido por colorimetria e demonstra aumento da absorbância em 610nm (92).

As células peritoneais foram coletadas de dez camundongos C57BL/6, centrifugadas a 4°C a 400xg, durante 10 minutos e quantificadas em câmara de Neubauer. Após esta etapa, as células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores para serem resuspensas em meio contendo vermelho de fenol com peroxidase. Os experimentos foram organizados em 2 etapas, cada uma com grupo de 5 camundongos sendo avaliados em momentos independentes, porém mantidas as mesmas condições. Foram realizados em triplicatas, em placas de microcultivo de fundo plano e 96 escavações (LabTech, Melbourn, Inglaterra). A cada escavação foram distribuídas 2×10^5 células, acrescidas das diferentes concentrações da miltefosina (0, 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Além da droga, algumas escavações foram estimuladas ou não com 20nM ou com 100nM de acetato forbol miristato (PMA) (Sigma) e na presença de vermelho de fenol e peroxidase tipo I correspondendo a 19 unidades de purpurogalina/mL (Sigma), em volume final de

140 μ L. A placa foi então incubada por 60 minutos a 37°C em câmara úmida contendo 5% de CO₂.

O PMA é o estímulo mais comumente usado para avaliar a produção celular de radicais livres de oxigênio, sendo altamente lipofílico e capaz de atravessar facilmente a membrana plasmática (93). O PMA promove indiretamente a ativação do complexo NADPH, que leva à produção de espécies reativas de oxigênio (94).

A curva padrão para determinação de H₂O₂ foi preparada a partir de uma solução estoque de H₂O₂ a 10 mM e foi composta por oito diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 μ M) de H₂O₂ em 140 μ L de vermelho de fenol acrescido de peroxidase. O padrão 0 μ M foi preparado apenas com vermelho de fenol acrescido de peroxidase. A curva foi distribuída em triplicata na placa de 96 poços, logo após a incubação.

A reação foi interrompida pela adição de 10 μ L NaOH 1N e as leituras de absorbância feitas em espectrofotômetro (SpectraMax® Plus384 microplate reader) em comprimento de onda de 610nm. Os resultados foram expressos em micromoles (μ M) de H₂O₂ (89).

3.8 Testes estatísticos

As variáveis estudadas foram analisadas quanto à normalidade empregando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. Para as comparações entre dois grupos com distribuição normal foi usado o teste t-pareado e para os grupos não normais, o teste de Wilcoxon. Para análise comparativa entre mais de dois grupos com distribuição normal foi utilizado o teste ANOVA, seguido do método Student-Newman-Keuls. Para grupos com distribuição não normal foi utilizado o teste Kruskal-wallis, seguido pelo método de Dunn. Utilizou-se o programa Prism® 5 Software Package (GraphPad, USA, 2005). Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

Os dados dos grupos com distribuição normal foram expressos como média e desvio padrão; enquanto que os dados com distribuição anormal foram expressos como mediana, quartis e extremos.

Foi empregado também um método disponível no programa Prism® 5 Software Package (GraphPad, USA, 2005) que combina regressão robusta e remoção de valores destoantes “*outliers*”, conhecido como método de ROUT (95). Desta forma, foi possível a identificação e exclusão dos valores destoantes nos grupos.

4 RESULTADOS

Conforme descrito na metodologia, os ensaios foram realizados em etapas independentes com subgrupos de camundongos, porém mantidas as mesmas condições experimentais. Os dados referentes a esses grupos menores de animais foram submetidos a análises estatísticas, porém os resultados foram semelhantes à análise do grupo como um todo. Diante disso, optou-se por apresentar os resultados que se referem ao conjunto de todos os camundongos estudados, permitindo assim uma melhor apuração estatística.

4.1 Efeito da miltefosina sobre a viabilidade das células peritoneais de camundongos C57BL/6

A incubação dos macrófagos peritoneais com a miltefosina mostrou significativo aumento no percentual de redução do MTT nas concentrações de 300, 600, 800 e 1600µg/mL da droga, alterando a média \pm DP para 133,6 \pm 15,7; 147,8 \pm 7,1; 152,6 \pm 28,1; 168,8 \pm 40,7 ($p < 0,05$, teste t pareado), em relação ao controle 0µg/mL, que apresentou média de 97,3 \pm 7,7 ($p < 0,05$, teste t pareado) (Figura 4). Isso significa que nas concentrações acima mencionadas, houve aumento da atividade mitocondrial dos macrófagos e, portanto, as células permaneceram viáveis.

Ao analisar comparativamente os grupos de macrófagos submetidos a diferentes doses de miltefosina, observou-se alteração nas médias dos percentuais de redução do MTT ($p < 0,001$, teste ANOVA). Comparando ao grupo exposto a 12,5µg/mL de miltefosina, houve aumento na média \pm DP dos percentuais de redução do MTT nas doses de 50, 150, 300, 600, 800 e 1600µg/mL ($p < 0,05$, teste de Student-Newman-Keuls).

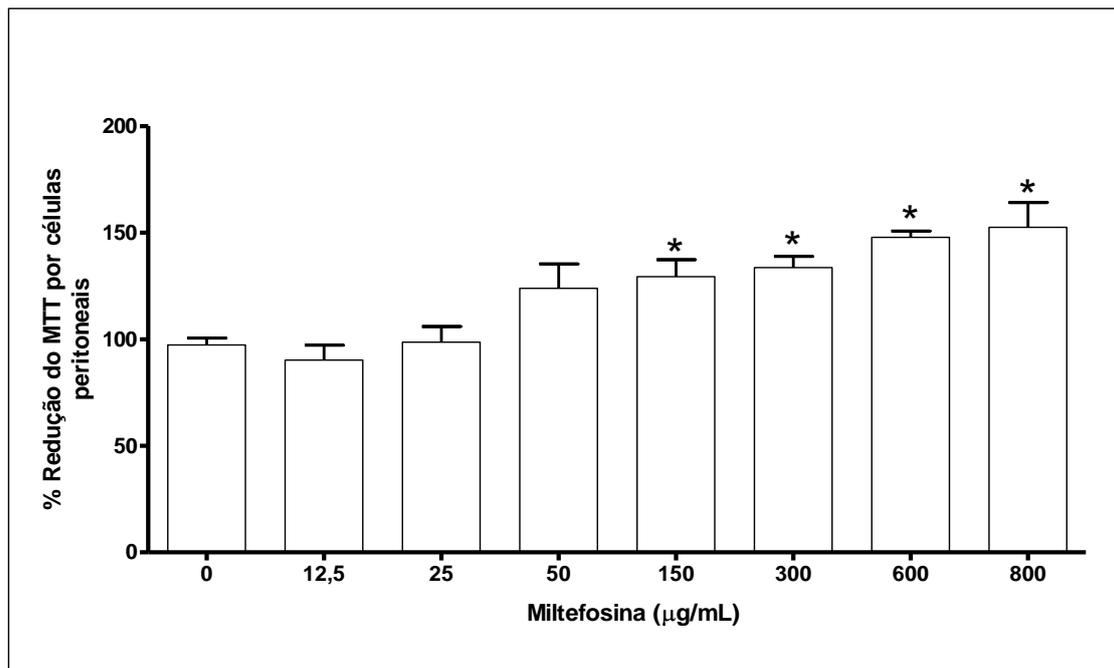


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de miltefosina sobre células peritoneais de camundongos C57BL/6 (n= 9) após a incubação por 4 horas na presença de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium). Os resultados mostraram que nas concentrações de 300, 600, 800 e 1600µg/mL de miltefosina houve aumento no percentual de redução do MTT pelos macrófagos peritoneais ($p < 0,05$, teste t pareado), significando um aumento da atividade mitocondrial. Estão representados as médias e os desvios padrão. Os valores percentuais apresentados foram calculados a partir das absorbâncias lidas pelo espectrofotômetro, tendo como parâmetro o grupo não exposto à miltefosina (controle), para o qual se atribuiu 100% de redução do MTT.

4.2 Efeito da miltefosina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6

4.2.1 Fagocitose de *S. cerevisiae* por receptores para padrões moleculares de patógenos

A avaliação da fagocitose por receptores para os padrões moleculares de patógenos foi possível utilizando *S. cerevisiae* na presença de soro fetal bovino inativado. Os resultados indicaram um aumento no índice fagocitário de macrófagos de camundongos C67BL/6 incubados com 50µg/mL de miltefosina, variando a mediana de 49,0 para 75,0 ($p = 0,003$, teste de Wilcoxon) (Figura 5A). Isso ocorreu devido ao aumento no percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em relação ao controle, variando a mediana de 18,5 para 35,5 ($p < 0,001$, teste de

Wilcoxon) (Figura 5B), embora tenha reduzido o número de leveduras fagocitadas por macrófagos em relação ao controle, variando a mediana de 3,0 para 2,2 ($p=0,004$, teste de Wilcoxon) (Figura 5C). Não foram observadas diferenças significativas nas outras dosagens testadas de miltefosina (10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em relação ao controle ($p>0,05$, teste de Wilcoxon).

Na avaliação comparativa do efeito das diferentes doses de miltefosina sobre os fagócitos, observou-se diferença significativa na mediana do índice fagocitário somente entre o grupo controle e o exposto a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da droga ($p<0,05$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações). Em relação ao percentual de células envolvidas na fagocitose, o grupo exposto a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou mediana superior aos demais grupos ($p<0,001$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações); porém esse grupo com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou significativo decréscimo na quantidade de macrófagos envolvidos na fagocitose em comparação ao grupo controle e ao grupo exposto a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p=0,002$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações).

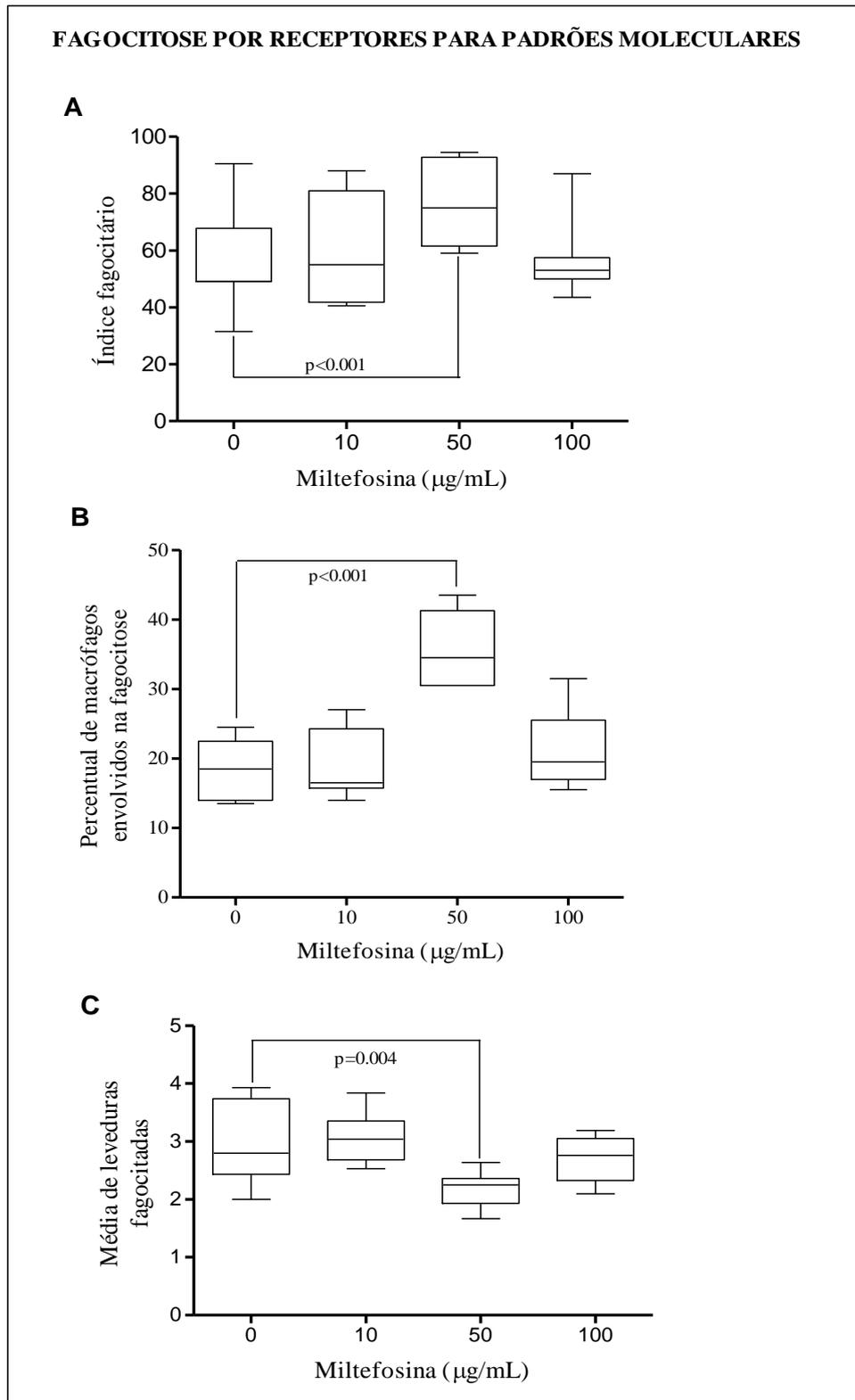


Figura 5. (A) Índice fagocitário (IF), (B) percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (%MEF) e (C) média de leveduras fagocitadas (MLF) por macrófagos peritoneais coletados de camundongos C57BL/6 normais ($n = 9$) e incubados por 30 min com miltefosina (0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) e com 4×10^6 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), na presença de soro fetal bovino. A miltefosina afetou a fagocitose por receptores para os padrões moleculares de patógenos, em relação ao controle, nas preparações incubadas com 50 $\mu\text{g/mL}$, pois aumentou a mediana do índice fagocitário ($p < 0,001$, teste de Wilcoxon) e a mediana do

percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose ($p < 0,001$, teste de Wilcoxon), embora tenha diminuído a mediana de leveduras fagocitadas ($p = 0,004$, teste de Wilcoxon). Estão representados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

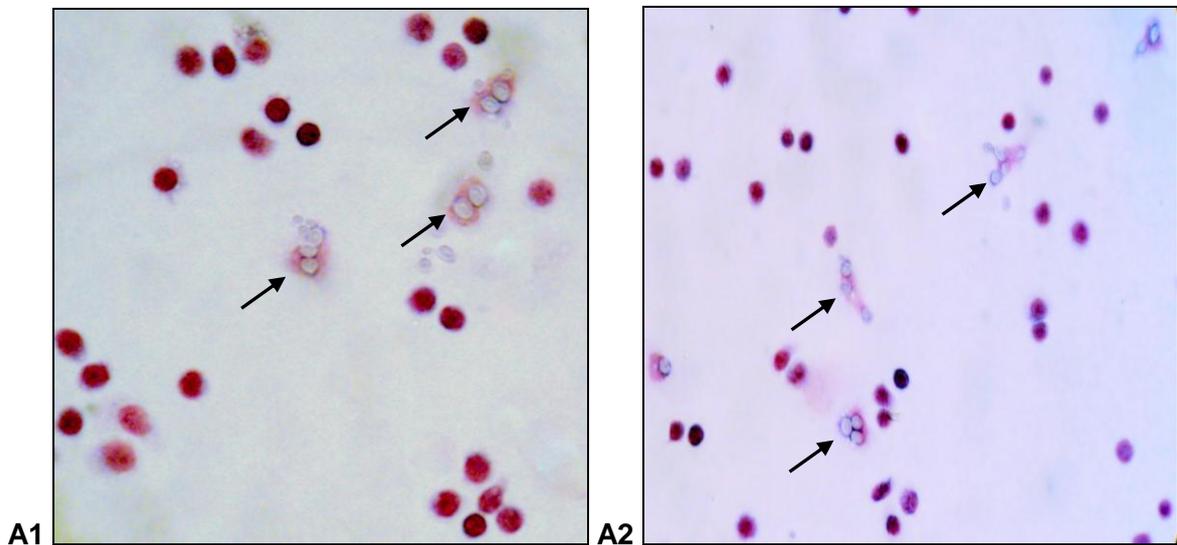


Figura 6. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 na ausência de miltefosina (A1) e incubados com 10 µg/mL de miltefosina (A2), na presença de soro fetal bovino. Microscópio óptico sob aumento de 100x, em óleo de imersão.

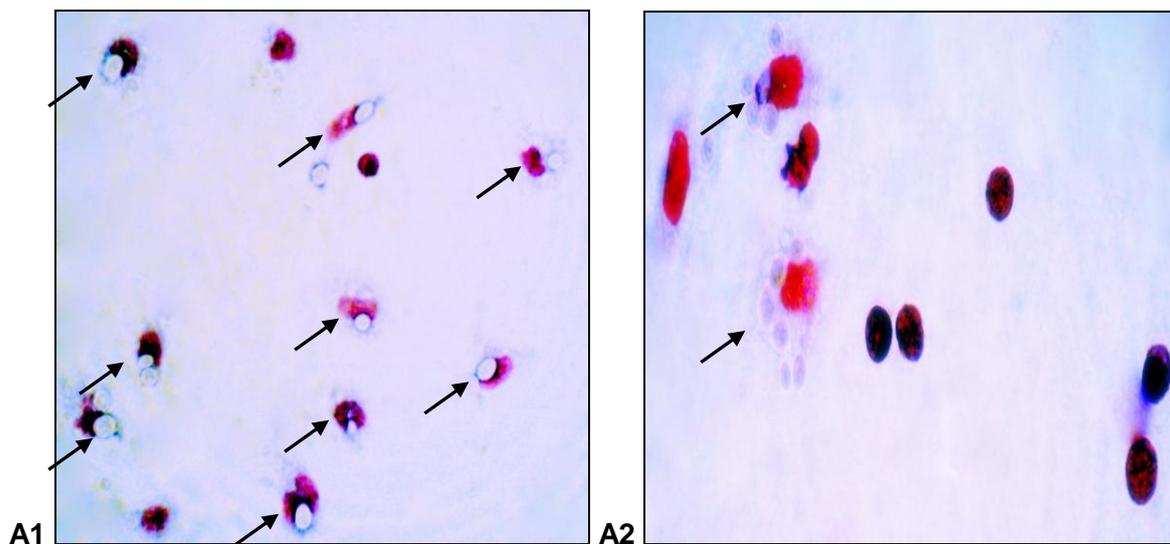


Figura 7. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 incubados com 50 µg/mL de miltefosina (A1) e com 100 µg/mL da droga (A2), na presença de soro fetal bovino. Microscópio óptico sob aumento de 100x, em óleo de imersão.

4.2.2 Fagocitose *S. cerevisiae* por receptores para opsoninas

Neste caso, a fagocitose foi avaliada utilizando *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas com soro fresco dos camundongos. Os resultados indicaram que, em relação ao controle, houve aumento significativo no índice fagocitário com 10µg/mL de miltefosina, com aumento na mediana de 202,0 para 382,5 ($p=0,001$, teste de Wilcoxon) ou 50µg/mL, com aumento na mediana de 202,0 para 602,0 ($p<0,001$, Teste de Wilcoxon) (Figura 8A). Isso ocorreu devido ao maior percentual de células envolvidas na fagocitose com 10µg/mL de miltefosina, variando a mediana de 25,5 para 30,5 ($p=0,023$, Teste de Wilcoxon) ou com 50µg/ml, variando a mediana de 25,5 para 52,0 ($p= 0,002$, Teste de Wilcoxon) (Figura 8B). Além de também ter ocorrido aumento na quantidade de leveduras fagocitadas por macrófago nas dosagens de 10µg/mL e 50µg/mL ($p=0,004$, teste de Wilcoxon) (Figura 8C). Nas escavações contendo 100µg/mL, a miltefosina não influenciou no número de leveduras ingeridas por macrófago, nem no percentual de células envolvidas na fagocitose, nem no índice fagocitário ($p>0,05$, teste de Wilcoxon).

Na avaliação comparativa do efeito das diferentes doses de miltefosina sobre os fagócitos, observou-se que o grupo exposto a 50µg/mL apresentou a mediana do índice fagocitário e do percentual de células envolvidas na fagocitose superior a do grupo controle e a do grupo exposto a 100µg/mL ($p<0,001$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações), não havendo diferenças significativas entre os demais grupos. Porém, em relação à média de leveduras fagocitadas, houve diferença significativa apenas entre o grupo exposto a 50µg/mL e o grupo controle ($p<0,05$, Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações).

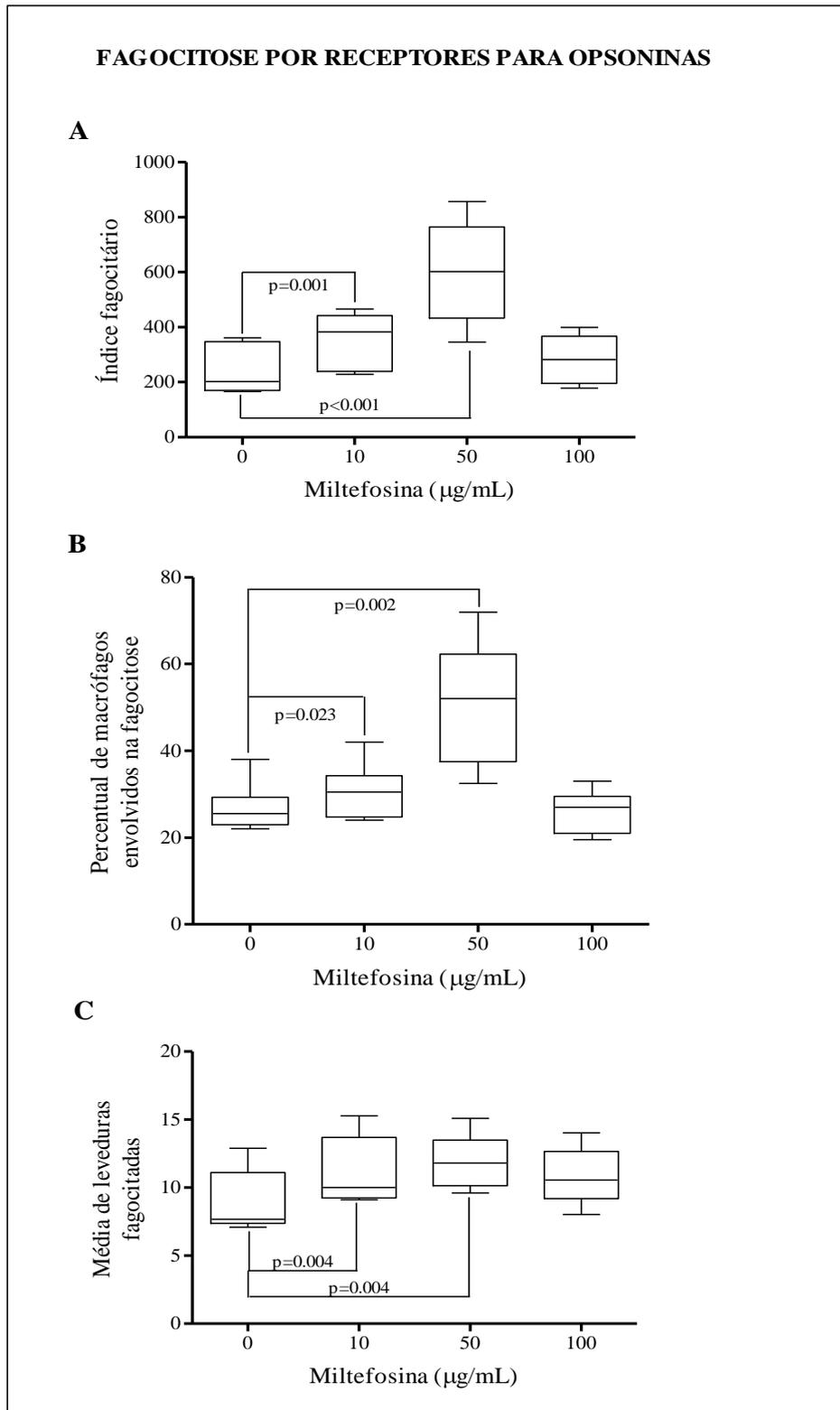


Figura 8. (A) Índice fagocitário (IF), (B) percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (%MEF) e (C) média de leveduras fagocitadas (MLF) por macrófagos peritoneais coletados de camundongos C57BL/6 ($n=9$) normais e incubados por 30 min com miltefosina (0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) e com 4×10^6 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), na presença de *pool* de soro dos camundongos. Houve, em relação ao controle, aumento do índice fagocitário com 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,001$, teste de Wilcoxon) ou 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$, teste de Wilcoxon), aumento no percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose com 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,023$, teste de

Wilcoxon) ou com 50 μ g/mL ($p=0,002$, teste de Wilcoxon) e na mediana de leveduras fagocitadas com 10 μ g/mL e com 50 μ g/mL de miltefosina ($p=0,004$, teste de Wilcoxon). Estão representados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

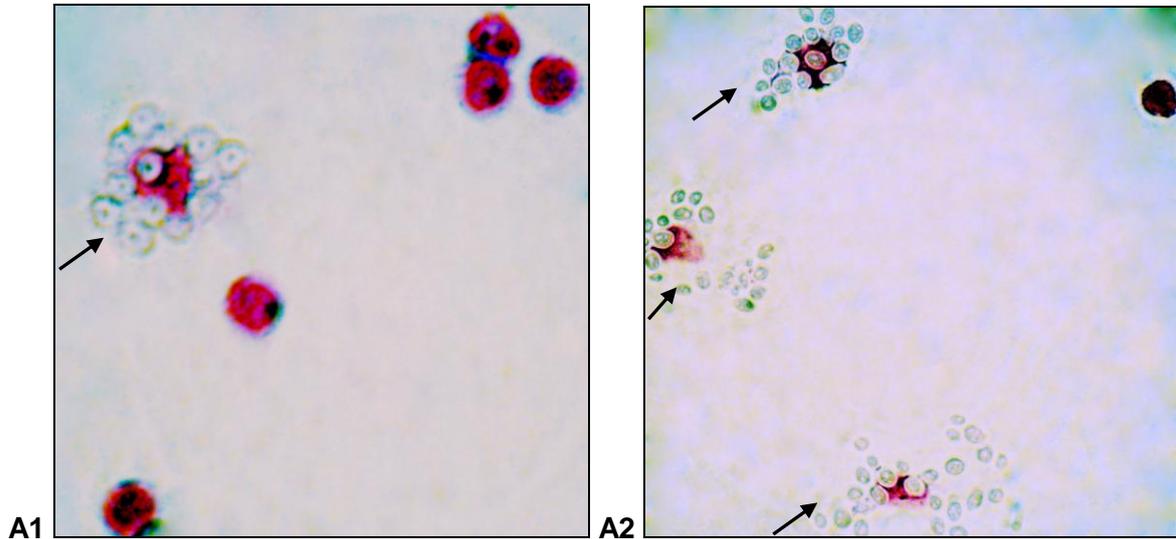


Figura 9. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 na ausência de miltefosina (A1) e incubados com 10 μ g/mL da droga (A2), na presença de soro fresco dos camundongos. Microscópio óptico sob aumento de 100x, em óleo de imersão.

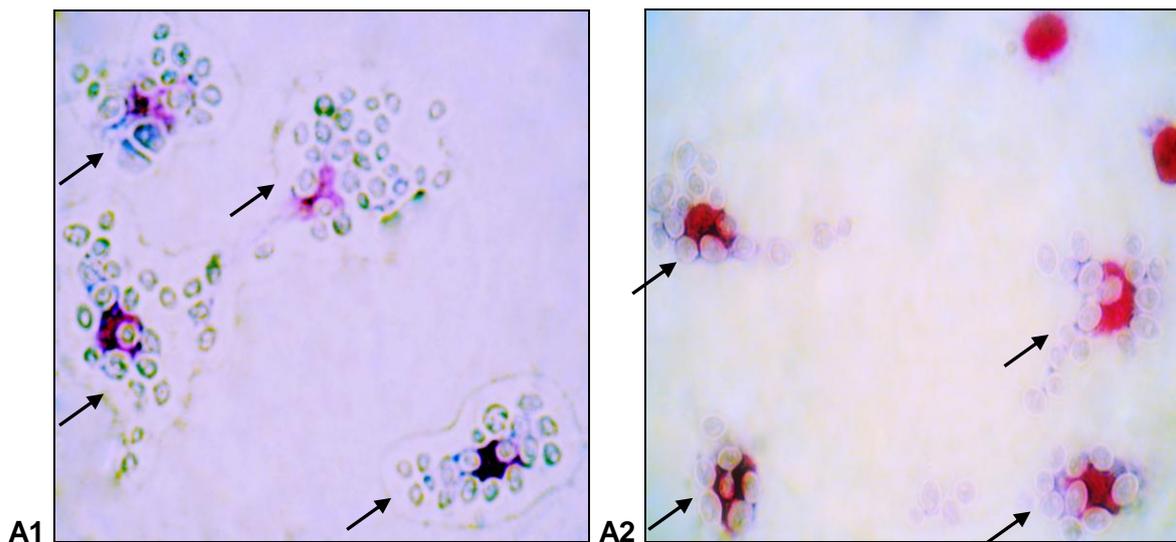


Figura 10. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 incubados com 50 μ g/mL (A1) e com 100 μ g/mL (A2) de miltefosina, na presença de soro fresco dos camundongos. Microscópio óptico sob aumento de 100x, em óleo de imersão.

4.3 Efeito da miltefosina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6

Todas as concentrações testadas de miltefosina diminuíram significativamente a produção basal de óxido nítrico. Observou-se que o grupo controle (0 μ g/mL) apresentou média de produção de 33,0 \pm 15,0 μ M de NO₂⁻, enquanto que os grupos com 10, 50 e 100 μ g/mL de miltefosina, apresentaram redução da média para 2,2 \pm 0,5; 1,7 \pm 0,7; 1,7 \pm 0,6 μ M de NO₂⁻, respectivamente (p <0,001, teste t pareado) (Figura 11A). Porém não houve diferença nas médias \pm DP entre os grupos de doses estudadas (p <0,001, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas), só havendo significância quando comparadas ao controle.

Nas escavações estimuladas com LPS e INF- γ , a miltefosina também promoveu uma expressiva depressão nas médias \pm DP da produção de óxido nítrico, passando de 74,0 \pm 13,2 μ M de NO₂⁻ no controle para 1,8 \pm 0,3 com 10 μ g/mL, para 1,8 \pm 1,0 com 50 μ g/mL e para 1,9 \pm 0,6 com 100 μ g/mL da droga (p <0,001, teste t pareado) (Figura 11D). Este mesmo padrão de inibição na produção de óxido nítrico foi observado nas escavações estimuladas somente com LPS (p <0,001, teste t pareado) (Figura 11B) ou estimuladas somente com INF- γ (p <0,001, teste t pareado) (Figura 11C).

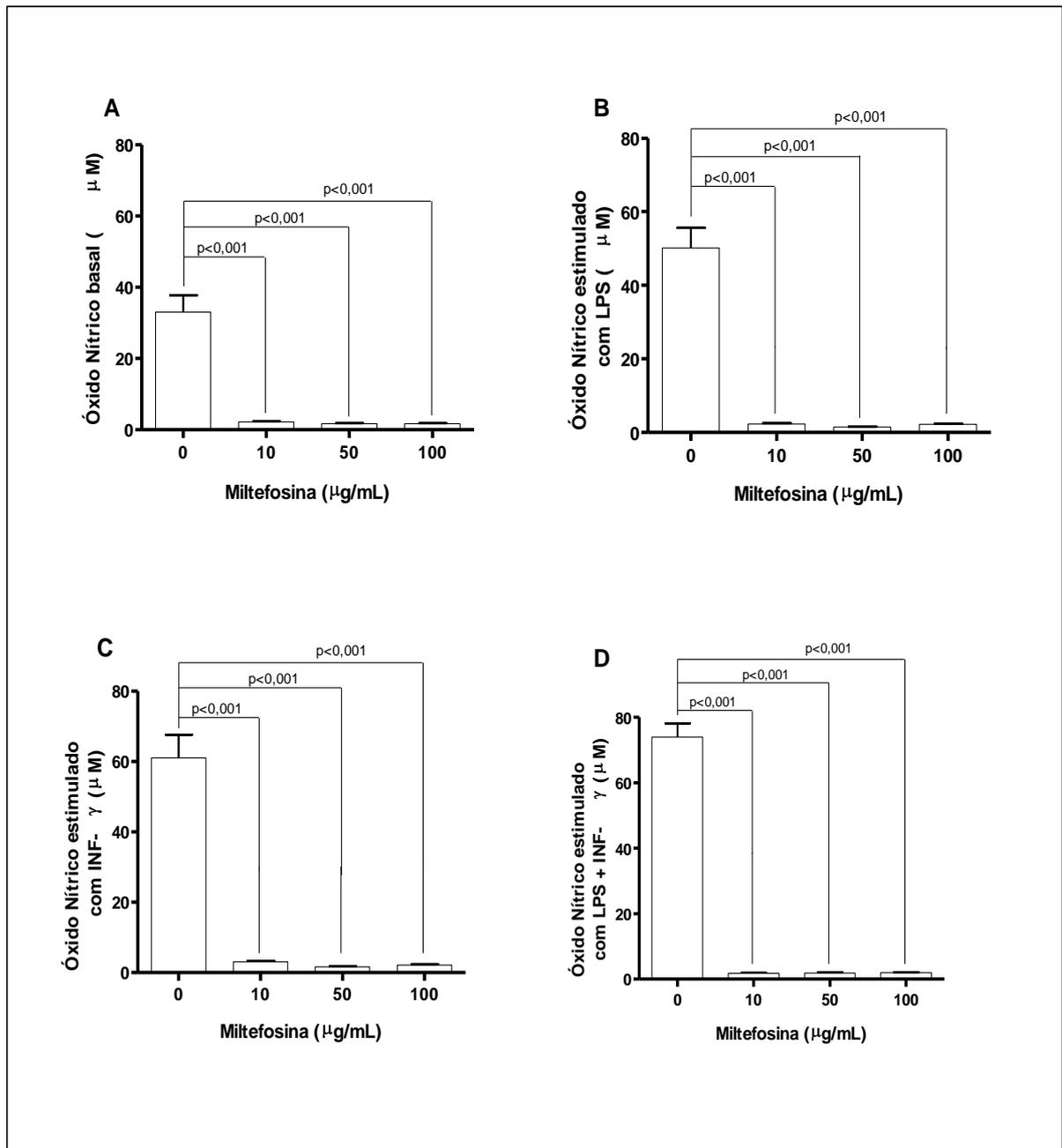


Figura 11. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 ($n= 10$) expostos a diferentes concentrações de miltefosina (0, 10, 50 e $100\mu\text{g/mL}$), quando não estimulados (A) ou estimulados com LPS (B) ou estimulados com INF- γ (C) ou com ambos LPS e INF- γ (D). Houve diferença estatística nas médias \pm DP da produção de NO basal, NO estimulado com LPS, NO estimulado com INF- γ e NO estimulado com LPS e INF- γ ($p < 0,001$, ANOVA). A miltefosina promoveu, nas três dosagens testadas (10, 50 e $100\mu\text{g/mL}$), uma queda significativa na produção de óxido nítrico em relação ao controle; não havendo diferença nas médias \pm DP entre os grupos de doses estudadas ($p < 0,001$, teste de Student-Newman-Keuls). Estão representados as médias e desvios padrão.

4.4 Efeito da miltefosina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6

Os resultados mostraram que nenhuma das doses testadas de miltefosina (10, 50 ou 100 μ g/mL) alterou a produção basal de peróxido de hidrogênio (controle= 0,9 \pm 0,8; 10 μ g/mL= 1,0 \pm 0,7; 50 μ g/mL= 0,9 \pm 0,8; 100 μ g/mL= 1,3 \pm 1,0) ($p > 0,05$, teste t pareado), conforme demonstrado na figura 12A.

Resultados semelhantes foram encontrados nas escavações estimuladas com 20nM de PMA (controle=1,0 \pm 0,9; 10 μ g/mL= 0,8 \pm 0,6; 50 μ g/mL=0,9 \pm 0,8; 100 μ g/mL=1,0 \pm 0,6) ($p > 0,05$, teste t pareado) (Figura 12B) e naquelas estimuladas com 100nM de PMA (controle=1,3 \pm 1,3; 10 μ g/mL= 1,1 \pm 0,9; 50 μ g/mL=1,3 \pm 0,7; 100 μ g/mL=1,2 \pm 0,9) ($p > 0,05$, teste t pareado) (Figura 12C).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias da produção basal de peróxido entre os grupos de doses de miltefosina testadas ($p = 0,74$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas). O mesmo padrão foi observado nos grupos estimulados com 20nM de PMA ($p = 0,49$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas) e com 100nM de PMA ($p = 0,95$, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas).

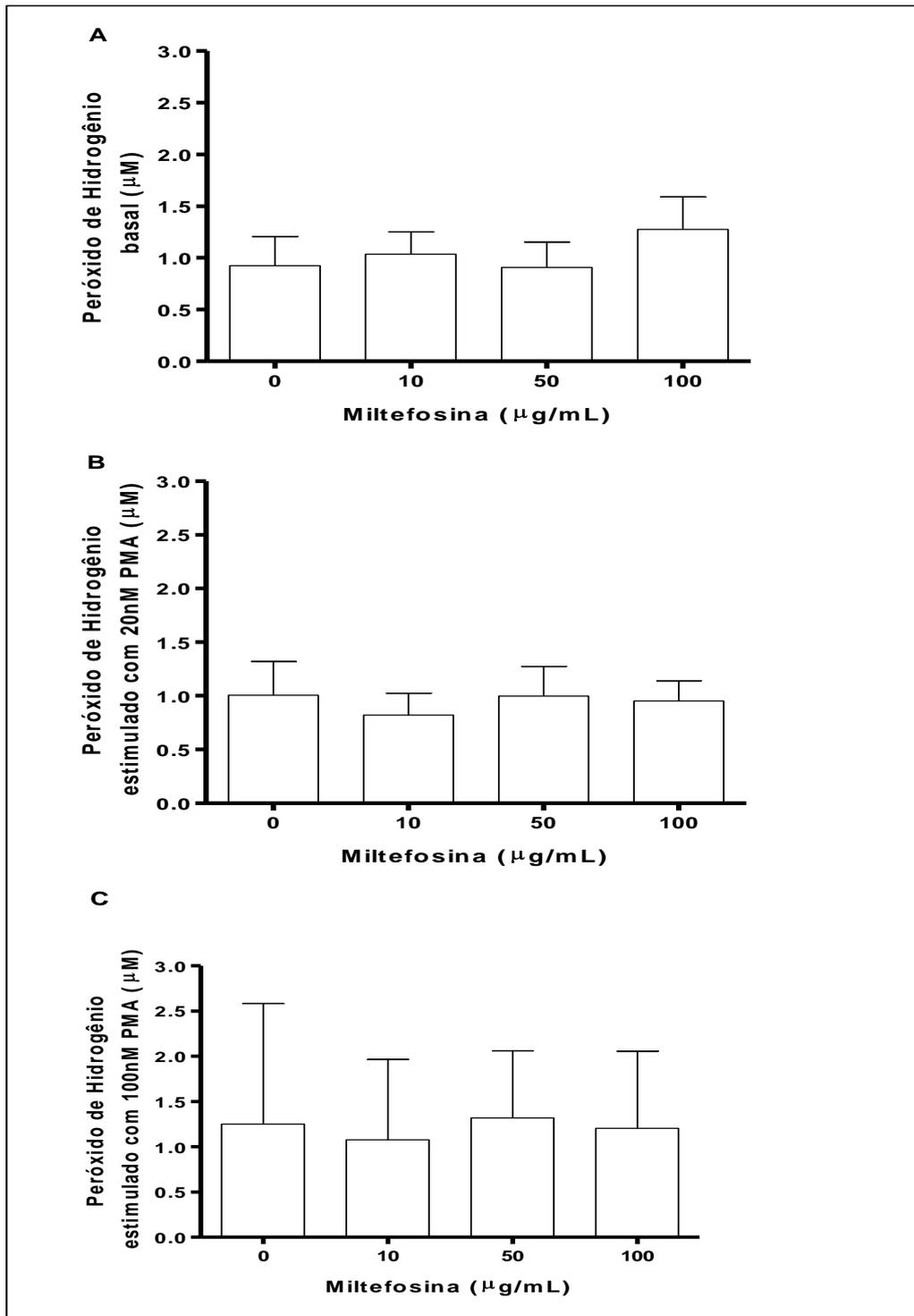


Figura 12. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 ($n=10$) incubados com diferentes concentrações de miltefosina (10, 50 e $100\mu\text{g/mL}$, quando não estimulados (A) ou estimulados com 20nM de PMA (B) ou estimulados com 100nM de PMA (C). Os resultados mostraram que nenhuma das doses testadas de miltefosina alterou a produção basal de peróxido de hidrogênio ($p>0,05$, teste t pareado) (A). Em B e C, não houve diferença estatística nas médias \pm DP de produção de H_2O_2 entre os grupos de diferentes doses testadas nas escavações estimuladas com 20nM ou com 100nM de PMA ($p>0,05$, teste de Student-Newman-Keuls), portanto não houve alteração na produção de peróxido. Estão representados as médias e desvios padrão.

5 DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que os macrófagos peritoneais permaneceram viáveis na presença da miltefosina, portanto a droga não foi tóxica às células nas dosagens testadas. Isto foi constatado pelo progressivo aumento no percentual de redução do MTT, que indicou um aumento da atividade mitocondrial.

A miltefosina já foi avaliada quanto à citotoxicidade sobre diferentes tipos celulares. Em macrófagos murinos (BMM Φ) não infectados, a droga apresentou baixa toxicidade, sendo a CI_{50} (concentração inibitória da droga que induz 50% de lise ou morte celular) maior que 25 μ g/mL (96), após 6h de incubação com MTT. Em células epiteliais da córnea de coelhos incubadas durante 96h com a miltefosina, a CI_{50} variou entre 62,5 e 125,0 μ M, equivalente a respectivamente, 25,5 e 50,9 μ g/mL, avaliada pelo método colorimétrico do Alamar Blue (97). Em macrófagos da linhagem J774A.1, a CI_{50} foi de 26,4 μ M, equivalente a 10,8 μ g/mL, avaliada pelo método da exclusão do azul de trypan após 72h de incubação (39).

Também foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de miltefosina sobre a sobrevivência de células dendríticas extraídas da medula óssea de camundongos C57BL/6 pelo método da anexina V/ iodeto de propídeo (53). Após 48h de incubação foi observado que, na concentração de 25 μ M (10,2 μ g/mL), a miltefosina já havia reduzido em 25% a sobrevivência celular em relação ao controle. O tratamento com 50 μ M (20,4 μ g/mL) levou a uma diminuição de 50% e as concentrações de 100 μ M (40,6 μ g/mL) ou mais levou à quase completa morte celular.

O presente estudo encontrou resultados diferentes das publicações mencionadas, inclusive não foi possível a identificação da CI_{50} , já que a droga não apresentou toxicidade aos macrófagos durante o período avaliado. As divergências encontradas podem estar relacionadas à utilização de diferentes metodologias, já que somente um dos trabalhos mencionados utilizou o método do MTT; também podem estar relacionadas ao emprego de diferentes tipos celulares e distintos períodos de incubação. No presente estudo o tempo total de incubação dos macrófagos com a miltefosina foi de 5h e talvez não tenha sido suficiente para permitir uma redução da viabilidade celular. Nos estudos citados, a incubação ocorreu durante 96h (97); 72h (39) e 48h (53). É importante considerar o tempo de

incubação, pois foi detectado que o efeito da concentração de 5 μ M ao longo do tempo resultou em aumento da morte celular com 72 e 96h em relação ao tempo de 48h (53).

O efeito da miltefosina sobre as células tem sido amplamente investigado em muitos países. Em células tumorais, a miltefosina tem como possíveis mecanismos de ação a alteração na composição da membrana e modulação da homeostase do cálcio (98), inibição da biossíntese de fosfolipídios, indução de diferenciação das células tumorais, efeitos na transdução de sinais em lipídeos (99,100) tais como: inibição de proteína cinase C (PKC), fosfolipase C (PLC) (101), alterações na fosfolipase A2 (102) ou na atividade da fosfolipase D (103), inibição da Na⁺-K⁺-ATPase e indução de apoptose (77) (104). Também já foi descrito que a edelfosina, que é um análogo de lisofosfolipídios (LPAs), como a miltefosina, induz a morte celular por apoptose seletivamente em células tumorais, preservando as células não-malignas (105). Além disso, há maior atividade de LPAs como inibidores da biossíntese fosfatidilcolina (PC) em parasitos do que em células de mamíferos, provavelmente devido a diferentes vias bioquímicas envolvidas nos dois tipos celulares, o que poderia explicar a sua ação seletiva antiparasitária *in vivo* (104,106).

Além dos efeitos da miltefosina sobre a viabilidade dos macrófagos, é essencial conhecer as implicações da droga sobre os mecanismos antiparasitários, como é o caso da fagocitose, que é a principal estratégia de defesa dos macrófagos contra leishmânias, na qual os macrófagos interiorizam o parasito e o destroem pela produção de espécies reativas de oxigênio e pela acidificação do fagolisossoma (16).

O processo de fagocitose envolve uma diversidade de receptores presentes na superfície do fagócito que interagem com ligantes na superfície do patógeno. Isso leva a polimerização da actina no local com conseqüente internalização e desencadeamento de sinalização intracelular acompanhada de tráfego de moléculas pela membrana, ativação de mecanismos microbicidas, rearranjo do citoesqueleto, formação do fagolisossoma, produção de citocinas, quimiocinas e produção de moléculas para o processo de apresentação do antígeno (14).

A capacidade fagocitária foi avaliada por receptores para os padrões moleculares de patógenos (rPMP), que incluem receptores para manose e glicana,

receptores de limpeza, entre outros; e por receptores para opsoninas, principalmente fragmentos do sistema complemento, usando-se *S. cerevisiae*, previamente incubadas com soro fetal bovino ou com *pool* de soro dos camundongos, respectivamente. Os resultados encontrados demonstraram que a fagocitose foi eficiente pelos dois tipos de receptores, porém a fagocitose foi melhor quando as leveduras foram previamente opsonizadas com soro fresco, pois neste último caso ocorreu também uma maior capacidade de internalização do patógeno, expressa pelo aumento na média de leveduras fagocitadas por macrófago.

Neste trabalho notou-se que o tratamento *in vitro* de macrófagos com 50µg/mL de miltefosina na presença de soro fetal bovino aumentou o índice fagocitário devido ao aumento no percentual de células envolvidas na fagocitose, embora tenha reduzido o número de leveduras fagocitadas por macrófago. Estes resultados podem ser explicados pela ação da miltefosina sobre a membrana celular (52). Foi descrito que as drogas análogas aos alquilfosfolipídios (APLs), como é o caso da miltefosina (hexadecilfosfocolina), possuem uma estrutura química que facilita a sua inserção em membranas lipídicas e resistem à degradação catabólica (52). A miltefosina interage com a membrana celular e rapidamente atinge outras membranas subcelulares (107,108), sendo capaz de afetar o metabolismo das células em diferentes níveis, inclusive podendo potencializar a fagocitose.

Uma explicação possível para a redução na média de leveduras fagocitadas é que a miltefosina tenha interferido nas vias de ativação responsáveis pela expressão dos receptores que reconhecem moléculas de manose e glicana na superfície dos patógenos; e por isso, tenha afetado a fagocitose de *Saccharomices cerevisiae*, que ocorre pela ação da glicoproteína dectina-1 que reconhece diretamente glicana β presente na superfície da levedura (14,109,110).

Como a fagocitose de leveduras ocorre pelos mesmos receptores que internalizam as leishmânias (111,112), é possível estendermos a interpretação dos achados neste estudo também para a fagocitose destes parasitos. As principais moléculas presentes na superfície das leishmânias são: a glicoproteína de superfície (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG), que contém resíduos de manose nas suas extremidades e facilitam a fagocitose via rPMP (113,114,115). Estas moléculas degradam a maioria das enzimas hidrolíticas lisossomais e inibem a produção de radicais livres de oxigênio pelas células do hospedeiro, constituindo um mecanismo

intrínseco de resistência do parasito (116). E, já foi descrito que a síntese de LPG e de gp63 está inibida em parasitos tratados com a miltefosina, contribuindo para o processo de morte da leishmânia (54).

Para que a miltefosina possa exercer sua ação sobre as leishmânias fagocitadas, a droga precisa atravessar a membrana da célula hospedeira (macrófago), membrana do fagolisossoma e finalmente a membrana plasmática do parasito. Em relação a esta última barreira, já foi demonstrado que a entrada do fármaco no parasito é mediada por transporte ativo dependente de proteínas (117) e o transportador de membrana que medeia esta internalização é denominado LdMT (*Leishmania donovani* Miltefosine Transporter) que se localiza na membrana plasmática do parasito (61).

Além disso, o tratamento com miltefosina é capaz de inibir a enzima citocromo C oxidase, que atua a nível da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, levando à diminuição do potencial de membrana mitocondrial (118,119), que induz processo de morte celular da *L. donovani* por apoptose (119,120). Atua também na transdução de sinais celulares inibindo a biosíntese de fosfolipídios e esteróis pelo parasito (64,78). Essa alteração no metabolismo dos esteróides é uma importante ação da miltefosina, já que os parasitos do gênero *Leishmania* sintetizam esteróides específicos e indispensáveis para o seu crescimento e viabilidade celular, os quais são do tipo ergostanos (ergosterol) (36).

A fagocitose na presença de soro fresco de camundongo avaliou a ingestão de leveduras por meio dos receptores para moléculas do sistema complemento ou fração Fc das imunoglobulinas presentes nas superfícies dos macrófagos e que se adsorvem na superfície das leveduras facilitando a fagocitose. Os dados demonstraram que houve aumento do índice fagocitário nos macrófagos expostos a diferentes concentrações de miltefosina, tanto devido ao aumento na média das leveduras fagocitadas por macrófago, como devido ao aumento no percentual de células envolvidas na fagocitose.

A ativação do sistema complemento por microorganismos, tanto pela via clássica como pela alternativa, resulta na deposição de opsoninas sobre a superfície do parasito, favorecendo a atividade microbicida das células fagocitárias. Assim como observado neste estudo, vários trabalhos mostraram que a fagocitose de microorganismos como *Cryptococcus neoformans* (121,122), *Candida albicans*

(123,124), *Mycobacterium tuberculosis* (125) e *Listeria monocytogenes* (126), *Paracoccidioides brasiliensis* (127), *Saccharomices cerevisiae* (112) na presença de soro fresco é mais eficiente do que com soro inativado, enfatizando a importância dos receptores para complemento para as células fagocitárias.

O aumento da fagocitose por receptores para opsoninas observado neste estudo pode ser explicado também pelas alterações na estrutura da membrana celular nativa induzidas pela ação da miltefosina na homeostase lipídica (52). Possivelmente a droga interfere diretamente na composição dos microdomínios lipídicos da membrana, também designados balsas lipídicas (*lipid rafts*), ricos em colesterol e esfingolipídios (128), que estão associados a proteínas com âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), tirosinas cinases da família Src e pequenas proteínas G (14,129), moléculas que estão envolvidas na fagocitose (130). Portanto, o tratamento com miltefosina pode ter afetado a funcionalidade destas proteínas, alterando receptores acoplados à proteína G e/ ou remodelando filamentos de actina (14), que pode ter aumentado a expressão dos receptores e, conseqüentemente, o número de leveduras ingeridas por macrófago; além de ter favorecido a quimiotaxia, que explica a grande quantidade de macrófagos envolvidos na fagocitose.

Os resultados deste estudo conflitam com a inibição dose-dependente da fagocitose induzida pela miltefosina observada em macrófagos extraídos da medula óssea de camundongos BALB/c (34); entretanto apresenta resultados semelhantes ao observado em estudo com macrófagos de hamsters, no qual foi verificado um aumento do índice fagocitário por ação da miltefosina (131). É possível que esta droga potencialize a fagocitose em macrófagos de camundongos C57BL/6 e em hamster, mas iniba em macrófagos de camundongos BALB/c, refletindo diferentes respostas celulares à ação dos fármacos, dependendo do modelo animal (132). Também já foi demonstrado uma maior competência basal dos macrófagos de camundongos C57BL/6 em relação aos camundongos BALB/c (133); pois observou-se, em grupos de animais normais, que a capacidade fagocitária basal dos C57BL/6 utilizando-se *Saccharomices cerevisiae*, foi maior em relação aos BALB/c. E é possível que esta melhor resposta imunitária dos C57BL/6 contribua para uma evolução mais benigna da doença.

Além da fagocitose, os macrófagos ativados passam a secretar mais de cem produtos, como enzimas, componentes do complemento, fatores de

coagulação, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, citocinas entre outros (134). Nesse estudo foi investigada a ação da miltefosina sobre a produção de reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio (NO e H₂O₂).

O NO é uma molécula reativa produzida a partir da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que se encontra altamente expressa em macrófagos ativados com LPS e INF- γ (135,136,137). A produção normal ou fisiológica de NO por fagócitos é benéfica para a defesa do hospedeiro contra microrganismos e parasitos, no entanto a superprodução de NO pode ser prejudicial e resultar em processos inflamatórios crônicos e agudos, além de atualmente estar relacionada com a promoção de angiogênese tumoral e metástase (138,139,140). Em tumores de mama, inibidores da iNOS vêm sendo utilizados na prevenção da angiogênese e, além disto, a terapia para prevenção de metástases no câncer pode ser acompanhada pela inativação da iNOS (141,142). Portanto, a identificação de novos agentes farmacológicos que possam prevenir a superprodução de NO e TNF- α é de considerável interesse médico (143,144,145).

Neste estudo verificou-se que todas as concentrações testadas da miltefosina promoveram uma expressiva depressão na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, tanto nas escavações não estimuladas, como nas estimuladas com LPS e/ ou INF- γ . Entretanto, alguns autores já observaram efeitos imunomoduladores da hexadecilfosfocolina (HPC). Foi relatado que a miltefosina age estimulando células T em cultivos de células mononucleares periféricas normais (PMNC) (71) e em células cancerígenas mamárias (MT-I) humanas xenotransplantadas em camundongos nude (75); também induz a produção de IFN- γ em células mononucleares humanas (146) e estimula a produção de óxido nítrico e de TNF- α na linha celular humana do linfoma histiocítico U937 (72). Também foi observado que em macrófagos peritoneais normais de BALB/c, a miltefosina não alterou a produção basal de NO, mas depois de estimulados com lipopolissacarídeos (LPS), *in vitro*, houve aumento na produção desta molécula (73). Resultados semelhantes foram detectados em macrófagos também extraídos de camundongos BALB/c, porém infectados *in vitro* com *L. donovani*, tendo ocorrido indução da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-12 e NO pela miltefosina (74) e em macrófagos peritoneais obtidos de hamsters infectados por *L. donovani* e tratados com miltefosina, também ocorreu aumento da produção de

radicais de nitrogênio (131). Em contraposição, a miltefosina foi eficaz na eliminação de formas amastigotas de *L. major* presentes em células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6, apesar de não ter alterado a produção de NO, nem a produção de citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10, que são essenciais para indução de respostas imunes (53). As diferentes respostas observadas nestes estudos podem ser decorrentes das diferenças metodológicas e também podem estar relacionadas à base genética das distintas linhagens dos animais estudados (132).

A inibição da produção de NO observada no presente estudo pode estar relacionada ao efeito da miltefosina inibindo vias metabólicas responsáveis pela produção da proteína quinase C (PKC). Sabe-se que o NO é produzido no interior dos macrófagos pela isoenzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na presença de citocinas (INF- γ e TNF- α) ou por indução de LPS (147), sob influência da atividade enzimática da PKC. No entanto, a miltefosina inibe a produção de PKC (148), provavelmente pela competição com a fosfatidilserina; o que pode levar esta droga a interferir na produção de NO.

Os achados deste trabalho colaboram na compreensão de alguns estudos anteriores realizados com camundongos deficientes de células T (76) e com camundongos deficientes em células T e B (37) infectados com *Leishmania donovani*, nos quais foi observada a eficácia da miltefosina, demonstrando a ação dessa droga independente da ativação do sistema imune (37,76).

Diante disso, é possível que o principal mecanismo de ação da miltefosina seja a toxicidade direta ao parasito, destruindo formas amastigotas no interior do fagócito (53). Entretanto o mecanismo exato desta toxicidade ainda está em processo de investigação, embora já se tenha documentado que a miltefosina interfere na biossíntese da âncora de glicosilfosfatidilinositol (149), bem como na inibição da acil-coenzima A aciltransferase, uma enzima envolvida na remodelação de lipídios em leishmânia (54). No caso de formas epimastigotas de *T. cruzi*, quando realizada análise ultraestrutural de parasitos tratados com análogos de lisofosfolipídios foi observado extensa formação de projeções de membrana (“blebs”) na região flagelar indicando que a membrana parece ser o principal alvo desses compostos (150,151).

Estes resultados referentes aos mecanismos de ação da miltefosina têm implicação importante para a prática clínica, quando comparado aos antimoniais, droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. Isso porque a atuação dos antimoniais pentavalentes não se resume à destruição direta do parasito, mas é dependente das respostas do hospedeiro, com a participação dos linfócitos T e citocinas (76,152). De fato, o estado imunológico do indivíduo influencia na ação do antimonial pentavalente, como observado no tratamento de pacientes co-infectados com Leishmaniose/HIV, em que se observou insucesso terapêutico (153).

Estudo realizado em ratos com depleção de células T sugerem que a utilização de miltefosina pode ser útil quer na fase aguda, quer em tratamento de manutenção da LV (76). Também há evidências de boas respostas na terapia com seres humanos imunodeprimidos (154,155,156). Contudo, a utilização da droga nesta população ainda é escassa, necessitando de maiores investigações em estudos prospectivos que confirmem a sua eficácia.

É possível que a inibição na produção NO pela miltefosina, observada neste estudo, também favoreça a melhor evolução da doença, diminuindo o processo de imunopatogênese da leishmaniose. Isto porque o óxido nítrico desempenha um papel crucial no dano tecidual através da sua interação com os radicais derivados do oxigênio, gerando moléculas efetoras altamente tóxicas, como peroxinitritos (157). Inclusive já foi relatado que a severidade das lesões exibidas por camundongos BALB/c (158) poderia estar relacionada à formação desta molécula, que tem alto potencial de lesão tecidual. Então é possível que a miltefosina, também ocasione a inibição da produção de peroxinitrito, o que diminuiria o dano tecidual, e conseqüentemente, reduziria efeitos deletérios da doença.

Quanto ao peróxido de hidrogênio, este corresponde a outro mediador químico produzido por macrófagos ativados durante uma resposta inflamatória, sendo ele um dos principais componentes do grupo de espécies reativas do oxigênio. O H_2O_2 passou a ser considerado um mensageiro nas cascatas de sinalização intracelular (159). Níveis intracelulares moderados de espécies reativas de oxigênio mostraram-se importantes como um estimulador de proliferação celular; porém, altos níveis podem resultar em dano celular, incluindo peroxidação dos

lipídeos, danos ao DNA, oxidação de proteínas e inativação de enzimas, que podem conduzir à morte celular (160,161,162).

Os resultados indicaram que a miltefosina não alterou a produção de peróxido de hidrogênio nos macrófagos de camundongos C57BL/6. É possível que as vias metabólicas que levam à produção de espécies reativas de oxigênio não sejam o principal alvo da miltefosina; e, portanto, a ação tóxica desta droga contra parasitos parece ocorrer independente da produção destes radicais. Além disso, também é possível que a produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos camundongos da linhagem C57BL/6 seja suficiente para favorecer os mecanismos microbicidas.

Foi avaliado o efeito da hipóxia em culturas de células dendríticas humanas infectadas com *L. amazonensis*, *in vitro*, sobre a ação das drogas leishmanicidas anfotericina B, antimonial pentavalente e miltefosina, durante 48 horas de tratamento (163). As curvas dose-resposta e análise das IC₅₀s da anfotericina B e do glucantime sugeriram que a hipóxia (6% de O₂ e 5% de CO₂) anulou ou diminuiu a ação destas drogas nas culturas de células, quando comparadas ao controle em normóxia (21% de O₂ e 5% de CO₂). No entanto, para a miltefosina a condição de hipóxia não alterou ou até mesmo potencializou a sua ação leishmanicida. Esse dado é relevante porque é necessária a presença do oxigênio disponível na célula para a formação de espécies reativas de oxigênio, como: radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH⁻) (164). Dessa forma, em situações de hipóxia prolongada, ocorre também deficiência na produção destes radicais, fragilizando as defesas da célula. Portanto, os resultados do estudo citado (163), associados aos achados no presente estudo, sugerem que a miltefosina age independente da produção de radicais de oxigênio, diferente do que ocorre com a anfoterina B e com o antimonial.

Outro estudo avaliou a produção do ânion superóxido por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, colhidos um dia após a administração intraperitoneal de ésteres de lisofosfolipídios; e a atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada pelo método do citocromo C, que consiste na inibição do citocromo C pelo superóxido gerado no sistema enzimático xantina/ xantina oxidase, na presença ou não de PMA (166). Foi verificado que um dos tratamentos não foi eficaz na estimulação da produção *in vitro* de superóxido pelos macrófagos,

enquanto que os outros dois compostos testados induziram uma maior produção na presença de PMA. Independente destes resultados os autores concluem que a citotoxicidade direta destes compostos para células leucêmicas promielocíticas humanas (HL60) não necessariamente se relacionam com a capacidade de cada droga para aumentar a produção do ânion superóxido em macrófagos (166). Esse dado é relevante para o presente estudo, pois há relação direta entre a produção desta molécula e da molécula de H_2O_2 . Isso porque o superóxido (O_2^-) pode seguir duas vias: a da dismutação que leva à produção de H_2O_2 ou pode reagir rapidamente com o NO formando o radical peroxinitrito que é extremamente tóxico (166).

Em estudo envolvendo seres humanos com leishmaniose tegumentar americana (133), observou-se que a produção de peróxido de hidrogênio permaneceu elevada, independente do tratamento com antimoniato de N-metil glucantime e associou a presença deste radical de oxigênio à escassez de parasitos nas lesões ulceradas dos indivíduos estudados, constatada pelos exames histopatológicos e pelas culturas. Entretanto, há uma preocupação em relação à presença exacerbada destes radicais, porque não causam a destruição somente do parasito, mas podem levar a danos oxidativos nas células não-infectadas (167) e podem contribuir para a imunopatogenia das úlceras cutâneas.

Portanto, este estudo mostrou que a miltefosina foi capaz de influenciar importantes funções do sistema imune inato dos macrófagos, principalmente potencializando a fagocitose. Além disso, é possível que a inibição da produção de óxido nítrico e a manutenção dos níveis de peróxido de hidrogênio tragam importantes implicações para o emprego deste medicamento na prática clínica, diminuindo a imunopatogênese da leishmaniose. Portanto, a elucidação dos mecanismos de ação da miltefosina sobre a resposta imune poderá implicar numa terapêutica mais adequada à doença. Embora já se tenha relatos acerca da eficácia da miltefosina oral contra a leishmaniose em modelos murinos (41) e em seres humanos (48,168), ainda há muito a se descobrir acerca desta droga.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com este trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

1- A miltefosina estimulou o metabolismo mitocondrial dos macrófagos, favorecendo os mecanismos de fosforilação oxidativa, que produzem o ATP responsável pela manutenção dos processos celulares que dependem de energia e não prejudicou a viabilidade celular.

2- A incubação de macrófagos com a miltefosina aumentou o índice fagocitário por receptores para padrões moleculares de patógenos, devido ao aumento no percentual de células envolvidas na fagocitose, embora tenha reduzido a média das leveduras fagocitadas por macrófago. Também potencializou o índice fagocitário por receptores para opsoninas, tanto devido ao aumento na média das leveduras fagocitadas por macrófago como devido ao aumento no percentual de células envolvidas na fagocitose. Portanto a miltefosina foi capaz de influenciar nesta importante função do sistema imune inato, que pode ser um dos principais mecanismos de ação da droga.

3- A miltefosina inibiu a produção de óxido nítrico pelos macrófagos em todas as concentrações testadas. Portanto, é possível que os mecanismos de ação da droga não dependam necessariamente dos radicais de nitrogênio. Tal achado pode favorecer o tratamento de pacientes co-infectados por leishmaniose e HIV, já que a miltefosina não depende intrinsecamente das respostas imunes do indivíduo para agir, como ocorre com os antimoniais. Além disso, pode contribuir para diminuir a imunopatogênese da leishmaniose, por reduzir os efeitos tóxicos ocasionados pela formação de peroxinitrito.

4- A não alteração na produção de peróxido de hidrogênio pela ação da miltefosina sobre os macrófagos dos camundongos C57BL/6 pode favorecer o controle das lesões cutâneas na leishmaniose tegumentar, porque diminui os efeitos deletérios gerados pelo excesso de radicais de oxigênio, que já se encontram alterados no organismo dos indivíduos doentes.

Portanto, o presente estudo contribuiu para uma melhor compreensão acerca dos efeitos da miltefosina sobre o sistema imunológico, indicando que este fármaco pode vir a ser uma esperança para o tratamento de pacientes imunodeprimidos, além de também poder contribuir para a diminuição da imunopatogênese da leishmaniose. Porém, ainda há necessidade de maiores investigações acerca dos mecanismos de ação desta droga.

7 PERSPECTIVAS

- Verificar o efeito da miltefosina no tratamento de camundongos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*, avaliando a capacidade fagocitária e a produção de radicais, comparando com a resposta ao tratamento com antimoniato de N-metil glucantime. É relevante também a utilização de diferentes linhagens de camundongos: BALB/c (isogênicos, suscetíveis à infecção pela leishmânia), C57BL/6 (isogênicos, resistentes à infecção pela leishmânia) e Swiss (linhagem não isogênica).
- Avaliar a influência do tratamento com miltefosina em pacientes com leishmaniose tegumentar por meio de testes que quantifiquem a capacidade fagocitária na ausência e na presença de opsoninas, a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio; comparando com o tratamento utilizando antimoniato de N-metil glucantime.

8 REFERÊNCIAS

1. Fiocruz. Fundação Oswaldo Cruz. Monitoramento e vigilância da leishmaniose tegumentar no Brasil. 2009. Acesso em 17 de out de 2009. Disponível em: <http://www4.ensp.Fiocruz.br/Leishmaniose/situacao-da-lt-no-brasil/>.
2. González U; Pinart M; Reveiz L; Alvar J. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. Cochrane Data base of Systematic Reviews. 2008; Issue 4. art. n. CD005067. DOI: 10.1002/14651858. CD005067. pub3.
3. WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. 2010. [Cited 2010 March 27]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.
4. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (SVS/ MS). Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009. Acesso em: 06 dez 2010a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/1_lta_casos_27_10_2010.pdf.
5. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (SVS/ MS). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009. Acesso em: 06 dez 2010b. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2_lv_casos_14_10_10.pdf.
6. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – 2. ed. Atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
7. Gontijo CMF; Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7(3):338-49.
8. Camargo-Neves VLF de; Glasser CM; Cruz LL; Almeida RG de. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo. SES-SP. São Paulo, 2006.
9. Shaha C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease Pathogenesis. Indian J Med Res. 2006; 123(3):233-44.
10. Carvalho EM; Barral A; Badaro R; Barral-Netto M. Immunology of human visceral leishmaniasis and perspective of the use of immunomodulators. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82, suppl.2, 137-46.
11. Santos MG dos. Papel funcional da fosfatidilserina de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na infecção de macrófagos. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2009.
12. Abbas AK; Lichtman AH; Pillai S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
13. Balestieri FMP. Imunologia. São Paulo: Manole, 2006.
14. Underhill DM; Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action.

- Annu Rev Immunol. 2002; 20:825-52.
15. Linehan AS; Martínez-Pomares L; Gordon S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infec.* 2000; 2(3):279-88.
 16. Cunningham AC. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72(2):132-41.
 17. Motta Junior MCM. Células do sistema imune. Acesso em: 03 de dez 2009 Disponível em: <http://ioh.medstudents.com.br/imuno2.htm>.
 18. Das M; Mukherjee SB; Shaha C. Hidrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donivani* promastigotes. *J Cell Sci.* 2001; 114:2461-69.
 19. Flora Filho R; Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. metabolismo, síntese e funções. *Rev Assoc Med Bras.* 2000; 46(3):265-71.
 20. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 109(1):33-44.
 21. Romão PRT; Dias R de O; Cruz KK; Marques FC de S; Monteiro MC. Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. 2008. Acesso: 25 nov 2009. Disponível: <http://periodicos.unesc.net/index.php/saude/article/viewPDFInterstitial/2/1>.
 22. Bogdan C; Röllinghoff M; Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000; 173:17-26.
 23. Wei XQ; Charles IG; Smith A; Ure J; Feng GJ; Huang FP; Xu D; Muller W; Moncada S; Liew FY. Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 1995; 375(6530):408-11.
 24. Stenger S; Donhauser N; Thüring H; Röllinghoff M; Bogdan C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1996; 183(4):1501-14.
 25. Yardley V; Ortuño N; Llano-Cuentas A; Chappuis F; Doncker S de; Ramirez L et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Is Antimonial Treatment Outcome Related to Parasite Drug Susceptibility? *J Infect Dis.* 2006; 194(8):1168-75.
 26. Arevalo J; Ramirez L; Adai V; Zimic M; Tulliano G; Miranda VC et al. Influence of *Leishmania* (Viannia) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007; 195(12):1846-51.
 27. Sampaio RNR; Paula CDR de; Sampaio JHD; Furtado R de S; Leal PP; Rosa TT; Rodrigues ME; Veiga JPR. Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do antimonial pentavalente administrado na dose de 40 mg sb /kg/dia, de 12/12h, por 30 dias na Forma Cutâneo-Mucosa de Leishmaniose. *Rev Soc Bras Med Trop. Uberaba,* 1997; 30(6):457-63.
 28. Name RQ; Borges KT; Nogueira LSC; Sampaio JHD; Tauil P; Sampaio RNR. Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with American cutaneous leishmaniasis attended at University Hospital of Brasilia, DF, Brazil. *An Bras Dermatol.* 2005; 80(3):249-54.

29. Lima EB; Porto C; Motta JCO; Sampaio RNR. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol.* 2007; 82(2):111-24.
30. Sampaio RNR; Martins Netto E; Faria EA; Sampaio JHD; Freitas, LCF de; Marsden, PD. Morte súbita causada por glucantime. *An Bras Dermatol.* 1988; 63(1):35-7
31. Singh RK; Pandey HP; Sundar S. Visceral leishmaniasis (kalazar): Challenges ahead. *Indian J Med Res.* 2006; 123(3):331-44.
32. Sampaio RNR; Marsden PD. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B liposomal. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997; 30(2):125-8.
33. Sampaio RNR; Rocha RAA; Marsden PD et al. Leishmaniose Tegumentar Americana Casuística do Hospital Escola da UnB. *An Bras Dermatol.* 1980; 58: 69-79.
34. Hilgard P; Kampher E; Nolan L; Pohl J; Reissmann T. Investigation into the immunological effects of miltefosina, a new anticancer agent under development. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1991; 117(5):403-8.
35. Hilgard P; Klenner T; Stekar J; Unger C. Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1993; 32(2):90-5.
36. Soares-Bezerra RJ; Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Rev Bras Cienc Farm.* 2004; 40(2):139-49.
37. Escobar P; Yardley V; Croft SL. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(6):1872-75.
38. Bhattacharya SK; Jha TK; Sundar S; Thakur CP; Engel J; Sindermann H; Junge K; Karbwang J; Bryceson AD; Berman JD. Efficacy and tolerability of miltefosina for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(2):217-21.
39. Azzouz S, Maache M, Garcia RG, Osuna A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96(1):60-5.
40. Campos JF de F. Ação leishmanicida in vitro da miltefosina 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. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, 2008.
41. Costa Filho AV; Lucas IC; Sampaio RNR. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de n-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* [online]. 2008; 41(4):424-7.

42. Rath S et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím nova* [online]. 2003; 26(4):550-5.
43. Sundar S; Murray HW. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in Índia. *Bull World Health Organization*. 2005; 83(5):394-5.
44. Dorlo TP; Van Thiel PP; Huitema AD; Keizer RJ; De Vries HJ; Beijnen JH; De Vries PJ. Pharmacokinetics of miltefosina in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(8):2855-60.
45. Soto J; Toledo J; Gutierrez P; Nicholls RS; Padilla J; Engel J; Fischer C; Voss A; Berman J. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin Infect Dis*. 2001; 33:E57–E61.
46. Soto J; Arana BA; Toledo J; Rizzo N; Vega JC; Diaz A; Luz M; Gutierrez P; Arboleda M; Berman JD; Junge K; Engel J; Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(9):1266-72.
47. Stojkovic M; Junghanss T; Krause E; Davidson RN. First case of typical Old World cutaneous leishmaniasis treated with miltefosine. *Int J Dermatol*. 2007; 46(4):385-7.
48. Soto J; Toledo J; Valda L; Balderrama M; Rea I; Parra R; Ardiles J; Soto P; Gómez A; Molleda F; Fuentelsaz C; Anders G; Sindermann H; Engel J; Berman J. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis*. 2007; 44(3):350-6.
49. Sundar S; Jha TK; Thakur CP; Engel J; Sindermann H; Fischer C; Junge K; Bryceson A; Berman J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med*. 2002; 347(28):1739-46.
50. Bhattacharya SK; Sinha PK; Sundar S; Thakur CP; Jha TK; Pandey K; Das VR; Kumar N; Lal C; Verma N; Singh VP; Ranjan A; Verma RB; Anders G; Sindermann H; Ganguly NK. Phase 4 trial of miltefosina for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007; 196(4):591-8.
51. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. 2006; Ano 3. n.26.
52. Jiménez-López JM; Rios-Marco P; Marco C; Segovia JL; Carrasco MP. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. *Lipids Health Dis*. 2010; 9:33.
53. Griewank K; Gazeau C; Eichhorn A; Von Stebut E. Miltefosina efficiently eliminates *Leishmania major* amastigotes from infected murine dendritic cells without altering their immune functions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(2):652-9.
54. Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; 111(1):1-14.
55. Verma NK; Dey C. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(8):3010-15.

56. Paris C; Loiseau PM; Bories C; Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3):852-9.
57. Croft SL; Snowden D; Yardley V. The activities of four anti-cancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 38(6):1041-7.
58. Le Fichoux Y; Rousseaus D; Ferrua B; Ruelle S; Lelievre A; Grousseau D; Kubar J. Short- and long- term efficacy of hexadecylphosphocoline against established *Leishmania infantum* infection in Balb/c mice. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42(3):654-8.
59. Croft SL; Sundar S; Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1):111-26.
60. Pérez-Victoria FJ; Sánchez-Cañete MP; Seifert K; Croft SL; Sundar S; Castanys S; Gamarro F. Mechanisms of experimental resistance of leishmania to miltefosine: implications for clinical use. *Drug Resist Updat.* 2006; 9(1-2):26-39.
61. Sánchez-Cañete, MMP. Implicación de las aminofosfolípido translocasas en la resistencia a miltefosina en *Leishmania*. Tesis (doctoral) – Universidad de Granada. 2009.
62. Sindermann H; Croft SL; Engel KR; Bommer W; Eibl HJ; Unger C; Engel J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2003, in press.
63. Soto J; Soto P. Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica [online].* 2006; 26, Suppl.1:207-17.
64. Croft SL; Engel J. Miltefosine- discovery of the antileishmanial activity of phospholipids derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100 Suppl 1:S4-8.
65. Berman JJ. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008; 4(9):1209-16.
66. Sampaio RNR; Lucas IC; Takami, HL. Inefficacy of the association N-methyl glucamine and topical miltefosine in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J venom anim toxins incl trop dis.* 2007; 13(3):598-606.
67. Zancanaro PCQ; Castro P; Motta JOC; Paula CDR; Porto C; Sampaio RNR. 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. 2007; p.48-49.
68. Ménez C; Buyse M; Dugave C; Farinotti R; Barratt G. Intestinal absorption of miltefosine: contribution of passive paracellular transport. *Pharm Res.* 2007; 24(3):546-54.

69. Fischer C; Voss A; Engel J. Development status of miltefosina as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2001; 190:85-87.
70. Doctoralia. Miltex. Acesso em: 26 dez 2010. Disponível em: <http://www.doctoralia.com.br/medicamento/miltex-14167>.
71. Vehmeyer K; Scheurich P; Eibl H; Unger C. Hexadecylphosphocoline-mediated enhancement of T cell responses to interleukin-2. *Cell Immunol.* 1991; 137(1):232-8.
72. Eue I; Zeisig R; Arndt D. Alkylphosphocoline induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1995; 121(6):350-6.
73. Zeisig R; Rudolf M; Eue I; Arndt D. Influence of hexadecylphosphocoline on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages *in vitro*. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1995; 121(2):69-75.
74. Wadhone P; Maiti M; Agarwal R; Karnat V; Martin S; Saha B. Miltefosine promotes IFN- γ -Dominated anti-leishmanial immune response. *J. Immunol.* 2009; 182(11):7146-54.
75. Safa O; Partin S; Mathew AM; Bibby MC. Morphological and immunological observations on the effects of hexadecylphosphocoline (HPC) in nude mice bearing MT-1 breast cancer xenografts. *Anticancer Res.* 1997; 7(1A):37-43.
76. Murray H; Delph-Etienne S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocoline (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidas mechanisms. *J Infect Dis.* 2000; 181:795-9.
77. Brachwitz H; Vollgraf C. Analogues of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. *Pharmac Ther.* 1995; 66(1):39-82.
78. Minodier P; Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease.* 2007; 5:150-158.
79. Medkoo. Informações sobre o produto: Miltefosine. Medkoo Biosciences, USA, 2010. Acesso em: 12 de novembro de 2010. Disponível em: <http://www.medkoo.com/Anticancer-trials/Miltefosine.htm>.
80. Rogers KA; Dekrey GK; Mbow ML; Gillespie RD; Brodskyn CI; Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *Fems Microbiology Letters.* 2002; 209(1):1-7.
81. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002. Dispões sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União (DOU), 21 de junho de 2002. Acesso em: 10 dez 2010. Disponível em URL: http://www.cfmv.org.br/porta/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf.

82. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2):55-63.
83. Moreira RCR et al. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). *Rev bras farmacogn [online]*. 2007; 17(1):59-63.
84. Lima AP; Pereira FC; Vilanova-Costa CAST; Ribeiro ASBB; Silveira-Lacerda EP. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis*. *Rev Eletronica Farm. Suplemento*. 2006; 3(2): 10-12, 2006.
85. Valadares MC; Castro NC de; Cunha LC da. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev Bras Cienc Farm*. 2007; 43(4): 631-638.
86. Marchese RM. Atividade de constituintes micromoleculares de *Renealmia alpina* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae) sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, 2009.
87. Muniz-Junqueira MI; Prata A; Tosta CE. Factors influencing phagocytosis of *Salmonella Typhimurium* by macrophages in murine schistosomiasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997; 30(2):101-106.
88. Tiunan TS; Ueda-Nakamura T; Cortez DAG; Dias Filho BP; Morgano-Diaz JÁ; Souza W de; Nakamura CV. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(1):176-182.
89. Kückelhaus SAS. Toxicidade e atividade antiparasitária da filosseptina-1, um peptídeo de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília; 2007.
90. Green LC; Wagner JG; Skipper PL; Wishnok JS; Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982; 126(1):131-138.
91. Promega. Griess Reagent System: instructions for use of product. 2009. Acesso em: 15 agosto de 2009. Disponível em: www.promega.com.
92. Pick E; Keysari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 1980; 38(1-2):161-170.
93. Lunardi F; Lima JH; Assreuy J. Comparative study of respiratory burst induced by phorbol ester and zymosan in human granulocytes. *Clin Biochem*. 2006; 39(1):78-85.
94. Lundqvist-Gustafsson H; Bengtsson T. Activation of the granule pool of the NADPH oxidase accelerates apoptosis in human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1999; 65, 196–204.
95. Graphpad Software. The ROUT method of identifying outliers. 2007. Acesso: 09 mai 2011. Disponível: <http://graphpad.com/help/prism5/prism5help.html>?

usingstatistical_analyses_step_by_s.htm.

96. Kayser O; Kiderlen AF; Bertels S; Siems K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:288-292.
97. McBride J; Mullen AB; Carter KC; Roberts CW. Differential cytotoxicity of phospholipid analogues to pathogenic *Acanthamoeba* species and mammalian cells. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(3):521-525.
98. Henke J; Engelmann J; Kutscher B; Nossner G; Engel J; Voegeli R; Leibfritz D. Changes of intracellular calcium, fatty acids and phospholipids during miltefosine induced apoptosis monitored by fluorescence- and ¹³C NMR-spectroscopy. *Anticancer Res.* 1999; 19:4027-32.
99. Arthur G; Bittman R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1390(1):85-102.
100. Ruiten GA; Verheij M; Zerp SF; Blitterswijk WJV. Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 49(2):415-9.
101. Berkovic D; Goeckenjan M; Luders S; Hiddemann W; Fleer EA. Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylinositol and phosphatidylcholine phospholipase C in human leukemia cells. *J Exp Ther Oncol.* 1996; 1:302-11.
102. Berkovic D; Luders S; Goeckenjan M; Hiddemann W; Fleer EA. Differential regulation of phospholipase A2 in human leukemia cells by the etherphospholipid analogue hexadecylphosphocholine. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53:1725-33.
103. Lucas L; Hernández-Alcoceba R; Penalva V; Lacal JC. Modulation of phospholipase D by hexadecylphosphorylcholine: a putative novel mechanism for its antitumoral activity. *Oncogene.* 2001; 20:1110-17.
104. Urbina JA. Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; Suppl 1:S9-S16.
105. Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martin-Martin B, Benito A, Martinez-Dalmau R et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res.* 1997; 57:1320-28.
106. Urbina JA. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology.* 1997; 114: 91-9.
107. Geilen CC; Wieder T; Haase A; Reutter W; Morré DM; Morré DJ. Uptake, subcellular distribution and metabolism of the phospholipid analogue hexadecylphosphocholine in MDCK cells. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1211:14-22.
108. Berkovic D; Wernicke JH; Fleer EA. Effects of etherlipid analogs on cell membrane functions. *J Exp Ther Oncol.* 2003; 3:185-93.

109. Brown GD; Gordon S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cellular Microbiology*. 2005; 7:471-9.
110. Taylor PR; Martinez-Pomares L; Stacey M; Lin H; Brown GD; Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:901-44.
111. Handman E; Bullen DV. Interaction of leishmânia with the host macrophage. *Trends Parasitol*. 2002; 18:332-34.
112. Muniz-Junqueira MI, Peçanha LMF, Silva-Filho VL da, Cardoso MC de A e Tosta CE. Novel Microtechnique for Assessment of Postnatal Maturation of the Phagocytic Function of Neutrophils and Monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(6):1096-102.
113. Descoteaux A; Turco SJ. Glycoconjugates in leishmania infectivity. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1455:341-52.
114. Lodge R; Descoteaux A. Modulation of phagolysosome biogenesis by lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol*. 2005; 114:256-65.
115. Olivier M; Gregory DJ; Forget G. Subversion mechanisms by which leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(2):293-305.
116. Duarte CS. Leishmaniose: que futuro nos reserva? Dissertação (Mestrado) - Universidade do Porto, Instituto de ciências biomédicas Abel Salazar, 2009.
117. Pérez-Victoria FJ; Castanys S; Gamarro F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:2397-403.
118. Luque-Ortega JR; Rivas L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome C oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51:1327-32.
119. Alzate JF; Arias A; Mollinedo F; Rico E; Iglesia-Vicente J de La; Jiménez-Ruiz, A. Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-X_L and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(10):3779-82.
120. Verma NK, Singh G; Dey CS. Miltefosina induz apoptose em arsenito resistente promastigotas de *Leishmania donovani* por disfunção mitocondrial. *Exp Parasitol*. 2007; 116(1):1-13.
121. Kozel TR. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9:34-46.
122. Kelly RM; Chen J; Yauch LE; Levitz SM. Opsonic requirements for dendritic cell mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2005; 73:592-8.
123. Gruber A; Lukasser-Vogl E; Von Zepelin MB; Dierich MP; Wurzner R. Human immunodeficiency virus type1 gp160/gp41 binding to *Candida albicans* selectively enhances candidal virulence in vitro. *J Infect Dis*. 1998; 177:1057-63.

124. Triebel T; Grillhosl B; Kacani L; Lell CP; Fuchs A; Speth C; Lass-Florl C; Steinmann J; Dierich MP; Wurzner R. Importance of the terminal complement components for immune defence against *Candida*. *Int J Med Microbiol*. 2003; 292:527-36.
125. Hirsch CS; Ellner JJ; Russell DG; Rich EA. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol*. 1994; 152:743-53.
126. Drevets DA; Leenen PJ; Campbell PA. Complement receptor type 3 mediates phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by a TNF-alpha- and IFNgammastimulated macrophage precursor hybrid. *Cell Immunol*. 1996; 169:1-6.
127. Calich VL, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF, Dias da Silva WD. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clin Immunol Immunopathol*. 1979; 12:21–30.
128. Lingwood D; Kaiser HJ; Levental I; Simons K. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans*. 2009; 37(5):955-60.
129. Simons K; Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997; 387(6633):569-72.
130. Ponce J; De la Ossa NP; Hurtado O; Millan M; Arenillas JF; Dávalos A; Gasull T. Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke*. 2008; 39:1269-75.
131. Sane SA; Shakya N; Gupta S. Immunomodulatory effect of picroliv on the efficacy of paromomycin and miltefosine in combination in experimental visceral leishmaniasis. *Exp. Parasitol*. 2011; 127:376-81.
132. Kuckelhaus CS; Kuckelhaus SAS; Muniz-Junqueira MI. Influence of long-term treatment with pravastatin on the survival, evolution of cutaneous lesion and weight of animals infected by *Leishmania amazonensis*. *Exp. Parasitol*. 2011; 127:658–64.
133. Saldanha RR de. Influência do tratamento com N-metil Glucamina sobre a fagocitose, a produção de radicais de oxigênio e de nitrogênio e a produção de FNT-[alfa], IFN-[gama] e IL-10 por fagócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e de camundongos infectados experimentalmente com *Leishmania amazonensis*. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, 2009.
134. Stites DP; Terr AI; Parslow TG. *Imunologia médica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
135. Nathan CF. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J*. 1992; 6:3051-64.
136. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, Elmsford. 2004; 40:845-59.

137. Bensinger SJ; Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. 2008; 454:470-77.
138. Thiemermann C; Vane J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol*. 1990; 182:591-95.
139. Bogdan C. The multiplex Function of Nitric Oxide in (Auto) immunity. *J Exp Med*. 1998; 187(9):1361-65.
140. Chen T; Stoner GD. Inducible nitric oxide synthase expression in N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced rat esophageal tumorigenesis. *Mol Carcinog*. 2004; 40:232-40.
141. Xie K; Fidler IJ. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. *Cancer Metastasis Rev*. 1998; 17:55-75.
142. Jadeski LC; Lala PK. Nitric oxide synthase inhibition by NG-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumour-induced angiogenesis in mammary tumours. *Am J Pathol*. 1999; 155:1381-90.
143. Manjeet KR; Ghosh B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. *Int J Immunopharmacol*. 1999; 21(7):435-43.
144. Carli CBA; Matos DC; Lopes FCM; Maia DCG; Dias MB; Sannomiya M; Rodrigues CM; Andreo MA; Vilegas W; Colombo LI; Carlos IZ. Isolated Flavonoids against Mammary Tumour Cells LM2. *Z Naturforsch C*. 2009; 64(1-2):32-6.
145. Hobbs AJ; Higgs A; Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39:191-220.
146. Hochhuth CH; Vehmeyer K; Eibl H; Unger C. Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. *Cell Immunol*. 1992; 141:161-8.
147. Garcia X; Stein F. Nitric Oxide. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2006; 17(2):55-7.
148. Überall F; Oberhuber H; Maly K; Zaknun J; Demuth L; Grunicke HH. Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. *Cancer Res*. 1991; 51:807-12.
149. Lux H, Hart DT, Parker PJ, Klenner T. Ether lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkylphospholipid analogues. *Adv Exp Med Biol*. 1996; 416:201-11.
150. Santa-Rita RM; Barbosa HS; Meirelles MN; Castro SL de. Effect of the alkyllysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 2000; 75:219-28.
151. Santa-Rita RM, Barbosa HS, Castro SL de. Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2006; 100:187-90.

152. Roberts WL; Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(9):1842-6.
153. Moreno J; Cañavate C; Chamizo C; Laguna F; Alvar J. HIV-*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94(3):328-32.
154. Thakur CP; Sinha PK; Singh RK; Hassan SM; Narain S. Miltefosine in a case of visceral leishmaniasis with HIV co-infection; and rising incidence of this disease in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94(6):696-7.
155. Sindermann H; Engel KR; Fisher C; Bommer W. Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2004; 39:1520-3.
156. Marques N; Sá R, Coelho F, Oliveira J, Cunha S da, Meliço-Silvestre. Será a miltefosina um avanço terapêutico na Leishmaniose Visceral, no doente co-infectado por VIH? 8º Congresso Virtual HIV/AIDS nos Países de Língua Portuguesa. 2007. Acesso em: 15 nov 2010. Disponível em: <http://www.aidscongress.net/html/comunicacaodbdf.html?num=333>.
157. Shaw CA; Taylor EL; Fox S; Megson IL; Rossi AG. Differential susceptibility to nitric oxide-evoked apoptosis in human inflammatory cells. *Free Radic Biol Med.* 2011; 50:93-101.
158. Liew FY; Li Y; Millott S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* 1990; 145:4306-10.
159. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 1999; 31:53-9.
160. Burdon RH. Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans.* 1996; 24:1028-32.
161. Dreher D; Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer.* 1996; 32:30-8.
162. Matos DC. Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e anti-tumoral de proteínas inativadoras de ribossomos extraídas de plantas. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Universidade Estadual Paulista, 2008.
163. Basetto MC. Avaliação dos efeitos do microambiente hipóxico em células dendríticas humanas infectadas com *Leishmania amazonensis*. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, 2007.
164. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept.* 2001; 10(1-2):125-40.

165. Schreiber BM, Layne MD, Modest EJ. Superoxide production by macrophages stimulated *in vivo* with synthetic ether lipids. *Lipids*. 1994; 29(4):237-42.
166. Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos JA, Intaglietta M; Heyde HVD. *Plasmodium berghei* Resists Killing by Reactive Oxygen Species. *Infect Immun*. 2005; 73(10):6704-10.
167. Kocyigit A; Keles H; Selek S; Guzel S; Celik H; Erel O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat Res*. 2005; 585(1-2):71-8.
168. Rahman SB; Bari AU; Mumtaz N. Miltefosine in cutaneous Leishmaniasis. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2007; 17(3):132-5.

ANEXO A
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 30 de junho de 2010.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**Análise do Efeito da Miltefosina Sobre a Funcionalidade de Macrófagos Peritoneais de Camundongos**”, UnBDOC nº. 11254/2010, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. 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 Sebbel
Coordenador do CEUA



ANEXO B
SOLUÇÕES E REAGENTES

Solução Salina Tamponada fosfatada (STF) pH 7,2 0,15 M (1x)

Na₂HPO₄ anidro (mm: 141,96 g/mol) 8,15 g
 KH₂PO₄ anidro (mm: 136,10 g/mol) 2,45 g
 NaCl (mm: 58,44 g/mol) 4,50 g
 Água destilada 1000 mL

Solução de nigrosina 0,05%

Nigrosina 0,05 g
 Tampão fosfato 0,15M pH 7,2 100 mL
 Filtrar e colocar em frasco âmbar
 Estocar a 4°C

Bicarbonato de sódio 7,5%

Pesar 7,5 g de bicarbonato de sódio
 Dissolver em 100 mL de água bidestilada
 Filtrar com filtro 0,02 µm

Meio de cultura RPMI 1640, PH 7,2, 1640

a) Meio estoque

Meio RPMI 1640, pH 7,2, (Sigma) 10,4 g
 Tampão Hepes (Sigma, mm: g/mol) 5,96 g
 Hipoxantina 2,50 mg
 Gentamicina 25,0 mg
 Água bidestilada 1000 mL
 Filtrar em membrana de 0,22 µL Guardar a 4°C por um mês

b) Meio RPMI 1640, pH 7,2, (incompleto)

RPMI 1640, PH 7,2, 1640 (sol. Estoque) 97,36 mL
 NaH₂CO₃ 7,5% 2,64 µL

c) Meio RPMI 1640, pH 7,2, (completo)

RPMI 1640, PH 7,2, 1640 (sol. Estoque) 87,36 mL
 NaH₂CO₃ a 7,5% 2,64 mL
 Soro fetal bovino 10,0 mL

Solução de vermelho de fenol 0,028 M

a) Solução estoque: Vermelho de fenol (Merck) 9,92 g
 Água bidestilada 1000 mL

b) Solução de uso: Peroxidase (85unidades) 200 µL
 Vermelho de fenol 200 µL
 Tampão fosfato 9,6 MI

Solução de Greiss

a) Solução estoque:

Solução estoque de sulfanilamida a 2% em H₃PO₄ a 5%

Sal sulfanilamida (Sigma) 500 mg

H₃PO₄ a 5% 25 mL

(2,5 mL H₃PO₄ + 47,5 mL de H₂O bidestilada)

NEED 0,2%

N-1-naphtylethylenediamine (Sigma) 50 mg

Água bidestilada 25 mL

b) Solução de uso:

Sulfanilamida 2% 10 mL

NEED 0,2 % 10 mL

OBS: Preparar 01 hora antes do término do período de incubação

ANEXO C
PLANILHAS E TABELAS

Tabela 1. Efeito da miltefosina sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 após a incubação por 4 horas na presença de MTT.

Grupos									
Animal	0µg/ml	10µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	150 µg/ml	300µg/ml	600µg/ml	800 µg/ml	1600 µg/ml
1	101,0	74,3	96,8	93,0	107,7	109,4	157,2	105,4	236,2
2	102,0	75,2	86,4	-	96,1	121,0	150,0	156,0	170,1
3	105,0	66,4	76,2	90,9	106,7	112,9	147,6	174,8	147,3
4	91,0	84,1	93,3	141,6	140,6	149,8	154,0	152,9	-
5	100,0	113,9	93,3	128,9	113,6	130,9	143,1	134,2	131,9
6	85,0	77,5	79,2	125,5	153,5	140,3	143,8	165,8	133,2
7	97,3	102,7	137,1	123,8	153,9	149,8	147,8	152,5	168,7
8	91,0	129,4	137,7	123,3	159,2	143,3	138,9	-	168,5
9	105,0	88,9	93,1	163,4	132,9	145,1	-	179,2	194,0

Tabela 2. Efeito da miltefosina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 incubados com 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* na presença de soro fetal bovino (A, B e C).

A.

% macrófagos envolvidos na fagocitose				
Grupos				
Animal	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	14,00	14,00	42,00	25,00
2	13,50	16,00	30,50	18,00
3	18,50	15,50	43,50	18,50
4	14,00	16,50	30,50	15,50
5	17,50	17,50	30,50	19,50
6	19,50	16,00	35,50	16,00
7	24,50	26,00	32,00	31,50
8	23,50	27,00	40,50	19,50
9	21,50	22,50	34,50	26,00

B.

Média de leveduras fagocitadas por macrófagos				
Grupos				
Animal	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	3,54	3,04	2,25	2,42
2	3,63	2,53	2,10	2,94
3	2,65	2,65	1,67	2,76
4	2,25	3,33	1,93	3,19
5	2,80	3,26	1,93	2,77
6	2,62	2,72	2,38	3,16
7	2,00	3,38	2,34	2,76
8	3,85	2,80	2,33	2,23
9	3,93	3,84	2,64	2,10

C.

Índice fagocitário				
Grupos				
Animal	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	49,50	42,50	94,50	60,50
2	49,00	40,50	64,00	53,00
3	49,00	41,00	72,50	51,00
4	31,50	55,00	59,00	49,50
5	84,50	86,50	91,00	54,50
6	49,00	57,00	59,00	54,00
7	49,00	88,00	75,00	87,00
8	90,50	75,50	94,50	43,50
9	51,00	43,50	84,50	50,50

Tabela 3. Efeito da miltefosina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 incubados com 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* na presença de soro fresco (A, B e C).

A.

% macrófagos envolvidos na fagocitose				
Grupos				
Animal	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	38,00	42,00	32,50	33,00
2	22,50	24,00	35,50	25,00
3	23,50	34,50	63,00	28,50
4	22,00	29,00	47,00	27,00
5	24,50	25,00	57,00	19,50
6	26,50	24,50	72,00	20,50
7	30,50	32,50	39,50	27,50
8	28,00	30,50	61,50	30,50
9	25,50	34,00	52,00	21,50

B.

Média de leveduras fagocitadas por macrófagos				
Grupos				
Animal	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	9,07	9,11	10,74	10,55
2	7,67	10,00	9,72	8,02
3	7,09	9,14	11,81	11,98
4	7,68	13,69	12,10	10,44
5	7,14	9,54	10,56	9,72
6	7,62	9,33	9,61	8,66
7	11,46	13,68	13,06	14,02
8	12,89	15,28	13,93	13,10
9	10,76	12,91	15,09	12,21

C.

Índice fagocitário				
Grupos				
Animal	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	344,50	382,50	349,00	348,00
2	172,50	240,00	345,00	200,50
3	166,50	315,50	744,00	341,50
4	169,00	397,00	568,50	282,00
5	175,00	238,50	602,00	189,50
6	202,00	228,50	692,00	177,50
7	349,50	444,50	516,00	385,50
8	361,00	466,00	857,00	399,50
9	274,50	439,00	784,50	262,50

Tabela 4. Efeito da miltefosina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6. Produção basal (A), após estímulo com LPS (B), LPS + INF- γ (C), INF- γ (D).

A.

Produção basal de óxido nítrico				
Grupos				
Animal	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
1	43,46	2,08	1,11	1,43
2	22,69	2,24	2,56	2,88
3	41,05	1,76	0,95	1,27
4	19,79	1,92	1,76	0,95
5	11,58	2,72	1,92	1,97
6	23,49	2,56	2,08	1,76
7	56,67	3,04	2,88	2,40
8	23,33	1,59	0,95	1,92
9	52,08	1,59	1,59	1,43
10	36,38	2,56	1,35	1,43

B.

Produção de óxido nítrico após estímulo com LPS				
Grupos				
Animal	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
1	62,22	3,04	1,11	1,84
2	37,59	2,56	1,43	2,80
3	49,66	2,32	1,35	1,59
4	35,17	3,04	1,43	2,24
5	20,68	3,04	1,76	1,76
6	46,28	2,32	1,11	2,40
7	68,74	2,08	1,11	2,56
8	43,38	1,59	2,56	1,35
9	79,13	1,11	1,11	2,08
10	58,84	1,59	1,59	3,29

C.

Produção de óxido nítrico após estímulo com LPS + INF- γ				
Grupos				
Animal	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
1	80,34	1,84	1,35	3,29
2	64,16	2,56	3,53	1,92
3	65,36	2,08	2,08	1,84
4	51,35	1,76	0,95	2,08
5	76,48	3,20	1,11	2,24
6	80,58	1,76	3,69	1,43
7	80,34	1,84	1,59	1,11
8	63,43	1,35	2,08	2,08
9	98,70	1,43	0,95	1,43
10	79,13	1,59	1,11	1,84

D.

Produção de óxido nítrico após estímulo com INF- γ				
Grupos				
Animal	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
1	74,86	4,25	1,92	1,76
2	54,57	2,88	1,59	2,24
3	61,66	4,01	1,27	4,25
4	54,73	2,72	1,76	1,92
5	14,32	3,53	1,59	1,76
6	64,56	2,56	3,37	1,59
7	83,72	3,21	1,76	1,11
8	46,68	2,72	0,95	2,88
9	87,91	1,92	0,79	1,43
10	67,94	3,04	1,43	2,56

Equação para cálculo das concentrações a partir das absorbâncias

$$y=a+bx$$

$$a=0,0517$$

$$b=0,00207$$

Tabela 5. Efeito da miltefosina sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6. Produção basal (A), após estímulo com 20nM de PMA (B), 100nM de PMA (C).

A.

Produção basal de peróxido de hidrogênio				
Grupos				
Animal	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
1	0,52	0,83	0,09	0,62
2	0,05	0,67	0,09	0,26
3	1,67	1,40	1,66	1,56
4	0,10	0,15	0,15	0,21
5	0,52	0,52	0,46	0,83
6	2,14	1,88	1,30	2,03
7	0,00	0,00	0,15	0,09
8	1,61	1,67	1,67	2,40
9	4,54*	1,61	1,88	2,03
10	1,72	1,64	1,64	2,72

*valor destoante- desconsiderado

B.

Produção de peróxido de hidrogênio após estímulo com 20nM de PMA				
Grupos				
Animal	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	0,67	0,36	0,67	0,83
2	0,21	0,62	0,41	0,15
3	0,00	0,00	0,09	0,21
4	2,40	1,09	2,83	1,82
5	0,52	0,05	0,36	0,57
6	0,00	0,15	0,15	0,41
7	2,25	1,46	1,93	1,46
8	1,56	1,51	1,19	1,32
9	4,43*	1,51	1,40	1,46
10	1,46	1,46	0,93	1,30

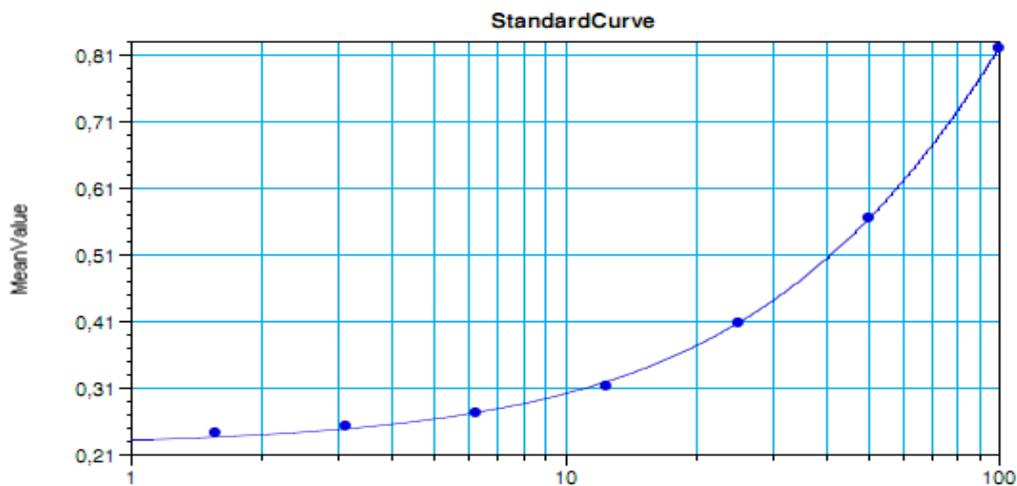
*valor destoante- desconsiderado

C.

Produção de peróxido de hidrogênio após estímulo com 100nM de PMA				
Grupos				
Animal	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	0,04	0,64	1,42	1,18
2	2,69	1,99	1,02	0,94
3	0,04	0,04	0,38	0,31
4	0,02	0,04	0,28	0,11
5	0,58	0,03	0,94	0,40
6	2,90	1,70	2,07	1,22
7	2,94	2,07	1,62	1,95
8	0,14	0,58	0,90	2,16
9	6,86*	1,78	2,11	2,73
10	1,91	1,91	2,45	1,06

*valor destoante- desconsiderado

Curva quantificação do peróxido (610nM)

Fórmula padrão (espectrofotômetro): $y = (A-D)/(1+(x/c)^B)+D$ Fórmula invertida para obter a concentração a partir da absorbância: $C*((A-D)/(ABS-D)-1)^{1/B}$ Dados curva: A= 0,222; B= 0,975; C= 370; D= 2,96; R²= 0,997.

ANEXO D
ARTIGO ENVIADO À REVISTA ACTA TROPICA

Effects of miltefosine on the function of peritoneal macrophages of C57BL/6 mice

C.B. Ponte^a, E.A.R. Alves^b, R.N.R. Sampaio^a, C.S. Kuckelhaus^b, M.I. Muniz-Junqueira^b,
*S.A.S. Kückelhaus^{b,c}

^aLaboratório de Dermatologicologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

^bLaboratório de Imunologia Celular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

^cÁrea de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

ABSTRACT

Miltefosine is a well-tolerated antileishmanial drug, currently used as an alternative to the toxic antimonials, to treat visceral and cutaneous leishmaniasis. It acts on the metabolism of phospholipids and glycoproteins of the membrane of parasites. It has also been reported that miltefosine interferes with the innate immune response of macrophages, so that our study aimed to evaluate its effects on macrophages, the main cells involved in the defense against *Leishmania*, using C57BL/6 mice, a less susceptible model of leishmaniasis, in order to elucidate the immunomodulatory action of the drug. To evaluate the effects of miltefosine on macrophages, peritoneal cells of mice were collected and phagocytosis of *S. cerevisiae*, hydrogen peroxide and nitric oxide production were assessed. Miltefosine increased by 53% the phagocytosis when it was used nonsensitized *S. cerevisiae*, for the concentration of 50 µg/mL of the drug ($p < 0.001$, Wilcoxon) and by 89% and 198% when assessed using sensitized *S. cerevisiae*, for 10 or 50 µg/mL of the drug ($p < 0.001$, Wilcoxon). All concentrations of miltefosine decreased, by at least 93%, the baseline (33.1 ± 15), or stimulated (50.2 ± 17.4) production of NO by the macrophages ($p < 0.001$, paired t test); however, it did not affect H_2O_2 production ($p > 0.05$, paired t test). As the phagocytosis is the main macrophage functions of innate immune system involved in the defense against *Leishmania*, our data suggest that miltefosine, beyond its microbicidal effects, favors the better evolution of leishmaniasis by improving macrophage functions through phagocytosis and by decreasing the immunopathogenesis of the disease dependent on radical species oxygen.

Key words: Miltefosine; Macrophages; Phagocytosis; Nitric oxide; Hydrogen peroxide.

Financial source: Partial FAP-DF and FINATEC-DF

*Corresponding author: selmak@unb.br.

Phone number: +55-61-3307-2273

Selma A. S. Kuckelhaus. Área de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil, 70.910-900. Fax: +55 61 3307 2272. E-mail: selmak@unb.br

1. Introduction

Miltefosine (hexadecylphosphocholine) is an antileishmanial drug effective, *in vitro*, against promastigote and amastigote forms of *Leishmania* (Azzouz et al., 2005). Currently, it is used as an alternative with lower toxicity than antimonials for treatment of visceral and cutaneous leishmaniasis in Indian, Paquistan and Colombia (WHO, 2010). Miltefosine is well tolerated, presents low toxicity and due to its oral formulation, treatment dispenses hospitalization.

The efficacy of miltefosine against *Leishmania* was firstly demonstrated in mice (Kuhlencord et al., 1992; Escobar et al., 2001; Croft and Engel, 2006; Costa Filho et al., 2008), followed by clinical trials in humans to treat cutaneous (Schraner et al., 2005; Soto et al., 2008) and visceral leishmaniasis (Sundar et al., 2002; Sundar et al., 2005; Bhattacharya et al., 2004; Bhattacharya et al., 2007). This efficacy is possibly related to its direct toxicity over parasites, because the drug alters the parasite membrane composition, interferes in the metabolism of phospholipids and in the biosynthesis of glycoproteins (Lux et al., 2000; Verma and Dey, 2004; Griewank et al., 2010). Miltefosine also activates the apoptosis paths in parasites (Paris et al., 2004; Barratt et al., 2009), but its mechanism of action remains unclear (Jiménez-López et al., 2010).

It has been reported that miltefosine affects the innate immune response of monocytes/macrophages, altering the phagocytosis (Hilgard et al., 1991), oxidative burst and cytokines by macrophages of BALB/c mice (Zeisig et al., 1995; Wadhone et al., 2009); as these cells are the main cells involved in the control of the leishmaniasis disease, it is important to clarify if the drug affects the mechanisms of defense against the parasite by these cells. Among the mechanisms of macrophages that can be affected by miltefosine, the phagocytosis deserves a highlight, because it depends on the fluidity of cell membrane and expression of receptors, which can be altered by drugs that interfere in the lipoprotein molecules, as miltefosine does (Basu and Ray, 2005). Furthermore, macrophages *in vitro* incubated with miltefosine increased the nitric oxide and TNF production by cells obtained from BALB/c mice (Zeisig et al., 1995). However, in *Leishmania*-infected- macrophages of C57BL/6 mice, this drug did not alter the production of the cytokines TNF- α , IL-12 p40, IL-12 p70 and IL-10, and it reestablished the production of nitric oxide, when co-incubated with IFN- γ and TNF- α (Griewank et al., 2010).

Considering that miltefosine can interfere with the main innate immune defense mechanisms against *Leishmania*, this study aimed to evaluate the effects of miltefosine on

phagocytosis, hydrogen peroxide and nitric oxide production by peritoneal macrophages, in order to elucidate the immunomodulatory effects of the drug in the C57BL/6 mice, a less susceptible model to leishmaniasis.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and ethics aspects

The Animal Research Ethical Committee of the University of Brasilia approved the experimental protocol of this work (process number 11254/2010). This study was exclusively designed and conducted by the authors, who have no conflict of interest.

Peritoneal macrophages were obtained from C57BL/6 female mice, 2–4 months old, by washing the peritoneal cavity with cold phosphate-buffered saline (PBS), to assess phagocytosis, hydrogen peroxide and nitric oxide production as described below.

2.2. Test of phagocytosis by macrophages

The effects of miltefosine (hexadecylphosphocholine, Zentaris, GmbH, Germany) towards macrophages were evaluated by incubating mouse peritoneal macrophages with different concentrations of the drug and assessing the phagocytic capacity. Peritoneal cells obtained by washing the peritoneal cavity with 10 mL of cold PBS, pH 7.2, were washed with cold PBS (400xg, 10 min), quantified in a haemocytometer and suspended into cold RPMI 1640 medium (Sigma), pH 7.2, supplemented with 20 mM HEPES (Sigma), 2 mM glutamine (Sigma) and 2.5 mg/dL gentamycin. Viability was assessed with 0.05% nigrosin solution in 0.15 M PBS, pH 7.2, and was always higher than 97%. The phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* was adapted from the technique previously described (Muniz-Junqueira et al. 2005). Briefly, samples of 2×10^5 macrophages in RPMI 1640 were placed on 13 mm-diameter glass coverlips in 24-well plastic plates, incubated for 2 h in a wet chamber, at 37°C, in the presence of 5% CO₂ in air. Following, the coverlips were rinsed with PBS, and adherent cells (>98% macrophages, average 16.84 ± 1.64 cells/coverslip) were incubated for 1 h with 4×10^6 *S. cerevisiae* yeast per well, prepared according to Muniz-Junqueira (2003), with or without miltefosine (0, 10, 50 or 100 µg/mL) suspended in 500 µL of RPMI 1640, supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (Invitrogen). Preparations were then rinsed with PBS at 37°C to eliminate non-phagocytosed *S. cerevisiae* yeast cells, fixed with absolute methanol, stained with 10% buffered Giemsa solution, pH 7.2, and the number of yeast cells bound to or ingested by macrophages in individual preparations was assessed by microscopy. Microscopic

fields distributed throughout the coverslips were randomly selected and all macrophages in each particular field were examined. The phagocytic index was calculated as the average number of attached plus ingested yeasts per phagocytosing macrophage multiplied by the percentage of these cells engaged in phagocytosis (Muniz-Junqueira et al., 2005).

2.4. Hydrogen peroxide Production

Hydrogen peroxide (H_2O_2) production by macrophages was assessed according to the method of horseradish peroxidase-dependent oxidation of phenol red, previously described (Muniz-Junqueira et al., 2006). In brief, macrophages were obtained from individual mice as above described and triplicate samples of 2×10^5 cells in RPMI 1640 were placed in each well in 96-well plastic microplates with 0, 10, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of miltefosine. After 1 h incubation with a solution containing 5.5 mM dextrose, 0.5 mM phenol red and 19 U/mL horseradish peroxidase type I RZ 1.0 (Sigma) and 20 nM phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma), the reaction was stopped by adding 10 μL 1N NaOH solution per well, and absorbance was read at 610 nm with a SpectraMax® Plus384 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The results were expressed as $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/2 \times 10^5$ macrophages/h.

2.5. Nitrite production

The nitrite (NO_2^-) quantification was performed in triplicate in the supernatants of 2×10^5 peritoneal macrophages incubated with 0, 10, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of per well, in a wet chamber, at 37°C with 5% CO_2 in air, in 96-well flat-bottom microplates, for 24 h, in the presence or not of lipopolysaccharide (50 ng/mL). Supernatants (100 μL) were incubated with equal volume of Griess reagent (1% sulphanilamide/0.1% N-1-naphthylethylene diamine dihydrochloride/ 2.5% H_3PO_4) at room temperature for 10 min. The absorbance was assessed by a SpectraMax® Plus384 microplate (Molecular Device, Sunnyvale, USA) at 540 nm. The results were expressed as $\mu\text{M NO}_2^-$ (Green et al., 1982).

2.6. Statistical analysis

The data were tested employing Bartlett's test for equal variances and the Kolmogorov–Smirnov test for the normality of their distribution before comparative analysis. The analyses were performed by the paired t test or Wilcoxon test to compare two pair-wised normal or non-normal samples, respectively, in the absence or presence of the drug. Data were uniformly expressed as median, quartiles and extreme values. Differences with a two-

tailed value of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The Prism 5® software package (GraphPad, USA) was employed for statistical tests and graphical design of the data.

3. Results

3.1. Phagocytosis

Miltefosine in the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ increased the phagocytic capacity of macrophages of C57BL/6 mice when assessed using nonsensitized *S. cerevisiae*, as shown in Fig. 1. Treatment of macrophages with miltefosine increased by 53% the phagocytic index of macrophages, from 40 for the untreated group to 75 for the group treated with 50 $\mu\text{g/mL}$ of the drug ($p < 0.001$, Wilcoxon) (Fig. 1, bottom). These effects were a result of the higher enhancement in the percentage of macrophages engaged in phagocytosis, although the drug decreased the number of particles ingested by the macrophage. In the absence of miltefosine, the percentage of macrophages engaged in phagocytosis was 19% while in the presence of 50 $\mu\text{g/mL}$ of miltefosine it was of 35%, ($p < 0.001$, Wilcoxon) (Fig. 1, middle). Differently, the number of *S. cerevisiae* ingested by the macrophages was higher in the absence of miltefosine (3) than in the presence of 50 $\mu\text{g/mL}$ of the drug (2) ($p = 0.004$, Wilcoxon) (Fig. 1, top). Other concentrations of miltefosine (10 or 100 $\mu\text{g/mL}$) did not affect the phagocytosis assessed with nonsensitized *S. cerevisiae* ($p > 0.05$, Wilcoxon) (Fig. 1).

When phagocytosis was assessed using sensitized *S. cerevisiae*, through opsonin receptors, miltefosine increased the median of phagocytic index by 89% when treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ (control=202; 10 $\mu\text{g/mL}$ = 383), and by 198% when treated with 50 $\mu\text{g/mL}$ (control=202; 50 $\mu\text{g/mL}$ =602) (Fig. 2). The increase in the phagocytic index was due to both to the enhancement in the percentage of macrophages engaged in phagocytosis (control=26%; 10 $\mu\text{g/mL}$ =31%; 50 $\mu\text{g/mL}$ =52%) ($p < 0.05$, Wilcoxon) (Fig. 2, middle) and to the number of *S. cerevisiae* ingested by the macrophages (0 $\mu\text{g/mL}$ =8; 10 $\mu\text{g/mL}$ =10; 50 $\mu\text{g/mL}$ =12) ($p < 0.05$, Wilcoxon) (Fig. 2, top). Using 100 $\mu\text{g/mL}$, miltefosine did not influence neither the number of *S. cerevisiae* ingested by macrophages, nor the percentage of macrophages engaged in phagocytosis, nor the phagocytic index ($p > 0.05$, Wilcoxon) (Fig. 2).

3.2. Production of hydrogen peroxide

Miltefosine (10, 50 or 100 $\mu\text{g/mL}$) did not influence the baseline production of hydrogen peroxide (control=0.9 \pm 0.8; 10 $\mu\text{g/mL}$ =1.0 \pm 0.7; 50 $\mu\text{g/mL}$ =0.9 \pm 0.8; 100

$\mu\text{g/mL}=1.3\pm 1.0$) ($p>0.05$, paired t test) as showed in figure 3 (top). Similar results were observed when assessed in the presence of concomitant stimulus with PMA (control= 1.0 ± 0.9 ; $10 \mu\text{g/mL}=0.8\pm 0.6$; $50 \mu\text{g/mL}=0.9\pm 0.8$; $100 \mu\text{g/mL}=1.0\pm 0.6$) ($p>0.05$, paired t test) (Fig. 3, bottom).

3.3. Production of nitric oxide

All concentrations of miltefosine significantly decreased the baseline production of nitric oxide (control= 33.1 ± 15.0 ; $10 \mu\text{g/mL}=2.2\pm 0.5$; $50 \mu\text{g/mL}=1.7\pm 0.7$; $100 \mu\text{g/mL}=1.7\pm 0.6$) ($p<0.001$, paired t test) (Fig. 4, top). The same was observed when macrophages were concomitantly stimulated with LPS, production of NO was significantly decreased by miltefosine treatment (control= 50.2 ± 17.4 ; $10 \mu\text{g/mL}=2.2\pm 0.7$; $50 \mu\text{g/mL}=1.5\pm 0.5$; $100 \mu\text{g/mL}=2.2\pm 0.6$) ($p<0.001$, paired t test) (Fig. 4, bottom).

4. Discussion

Our work showed the influence of miltefosine on phagocytic function, hydrogen peroxide and nitric oxide production by macrophages of C57BL/6 mice. Our results shed a light on the immunomodulatory effect of miltefosine on innate immune response, using C57BL6 mice.

Miltefosine increased the phagocytic capacity of macrophages by increasing the number of particles ingested, either when phagocytosis was assessed using nonsensitized ($50 \mu\text{g/mL}$) or sensitized *S. cerevisiae* (10 and $50 \mu\text{g/mL}$), suggesting that the drug increased the expression of receptors on the macrophage surface and influenced phagocytosis through the same receptors by which phagocytes uptake *Leishmania* (Underhill and Ozinsky, 2002; Handman and Bullen, 2002; Muniz-Junqueira et al., 2003). Furthermore, the drug also increased the percentage of macrophages engaged in phagocytosis, when phagocytosis was assessed using opsonins, suggesting miltefosine also enhanced the chemotaxis of macrophages (Muniz-Junqueira et al., 2003; Muniz-Junqueira et al., 2008).

It is possible miltefosine improved phagocytosis through the increment in fluidity of the membrane of the macrophage that occurs by the inhibition of the *de novo* synthesis of phosphatidylcholine, a major component of biological membranes, by the drug, (Lira et al., 2001), consequently improving chemotaxis, motility, adherence of the macrophage and phagocytosis (Geilen et al., 1994; Zeisig et al., 1995; Forman and Torres, 2002; Berkovic et al., 2003; Weller et al., 2009; Hartmann et al., 2010; Jiménez-López et al., 2010; Patwardhan and Liu, 2011).

Another possibility to explain the increment in phagocytosis by miltefosine is a possible interference of the drug directly in the composition of the lipids domains of the membrane. One of the important features of cellular membranes is that they can form localized regions with specific molecular compositions and physical properties that differ from the average properties of the rest of the membrane. These membrane microdomains, also known as lipid rafts, are defined by their sphingolipid- and cholesterol-rich nature, enrichment in GPI-anchored proteins and membrane-anchored signaling molecules, and cytoskeletal association. Lipids have an important effect on the phase behavior of these membrane lipid rafts, which have been shown to function as signal transduction platforms. Glycosphingolipid-enriched microdomains contain signal transducers, such as Src family kinases and small G proteins (Underhill and Ozinsky, 2002), molecules that are involved in phagocytosis (Ponce et al., 2008). So that, lipid rafts function as platforms that allow local concentration of raft-associated proteins, promoting the interaction of protein complexes, and modulating signaling. Therefore, treatment with miltefosine might affect the functionality of proteins associated to lipid rafts, for instance, receptors and actin remodeling (Underhill and Ozinsky, 2002). In fact, our data shown that miltefosine increased the number of particles ingested by macrophage, which suggests an enhancement on the expression of receptors, and the number of phagocytes engaged in phagocytosis, which suggests an enhancement on chemotaxis, consequently, higher endocytosis of *S.cerevisiae*, as observed in our results.

Our data conflict with a dose-dependent inhibition of phagocytosis by miltefosine observed to macrophages of BALB/c mice (Hilgard et al., 1991), but agree with the enhanced phagocytosis observed to macrophages of hamsters (Sane et al., 2011). It is possible that miltefosine increases the phagocytosis by macrophages of C57BL/6 mice and hamsters, but inhibits those by the macrophages of BALB/c mice, reflecting the different kind of response to treatment observed by these animals models, as was shown by Kuckelhaus et al. (2011).

Miltefosine also inhibited nitric oxide production, but the drug was not able to influence hydrogen peroxide production by macrophages of C57BL/6 mice. Reactive oxygen species and NO are the main molecules involved in the defense against pathogens and their production depends on infection, stimulus or drugs. Our results showed that miltefosine inhibited the production of nitric oxide (NO), in the presence or not of lipopolysaccharide (LPS), but the drug did not alter the production of hydrogen peroxide by macrophages of C57BL/6 mice. Opposite response was observed for macrophages obtained from *L. donovani*-infected hamsters treated with miltefosine, which increased the production of nitrogen metabolites (Sane et al., 2011). In addition, macrophages from BALB/c mice, in vitro,

infected with *Leishmania* have its capacity to produce nitric oxide reestablished after stimulation with IFN- γ , TNF- α and IL-12 (Wadhone et al., 2009). Furthermore, it was shown that miltefosine did not alter the baseline NO production by macrophages from BALB/c mice, but after in vitro stimulated with LPS it was observed an increase in the production of this molecule (Zeisig et al., 1995). Griewank et al. (2010) observed no influence of miltefosine on the capacity of dendritic cells of C57BL/6 mice infected with *L. major* to produce NO. The different responses observed in these studies may reflect methodological differences among them. It may also be caused by different responses due to genetic backgrounds of the different lineage of the mice studied (Kuckelhaus et al., 2011).

The mechanism by which miltefosine inhibits NO production observed in this study could be related to the inhibition of the metabolic pathways by the drug. NO is produced by oxidation of L-arginin via inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Lechner et al., 2005), in presence of cytokines, as IFN- γ and TNF- α , or LPS (Garcia and Stein, 2006), as an effect of the enzymatic activity of protein kinase C (PKC). It is possible that the synthesis of NO was inhibited by miltefosine through the inhibition of the PKC, by competition with the biological activator phosphatidylserine (Uberall et al., 1991; Hilgard et al., 1993).

Considering that for clearance, parasites need to be exposed to microbicidal factors inside lysosomes and to oxidative machinery of the macrophages (Garcia and Stein, 2006), it is possible that baseline production of hydrogen peroxide by macrophages of C57BL/6 mice genetic background to be enough to eliminate parasites.

It is possible that the inhibition of NO by miltefosine, observed in this work, favor the better evolution of the disease, by decreasing the immunopathogenesis process of the leishmaniasis disease. Nitric oxide plays a critical role in tissue damage through its interaction with oxygen-derived radicals, generating highly toxic effectors molecules, such as peroxynitrites (Shaw et al., 2011). Once miltefosine inhibits the production of NO, it is possible that production of peroxynitrite was also inhibited, which favor lower tissue damage and consequently, better evolution of the disease.

In conclusion, we demonstrated that miltefosine influenced the macrophage functions enhancing the phagocytosis, both when it was assessed without or with opsonins. We also observed that miltefosine inhibited NO production, but did not affect the hydrogen peroxide. As these functions of phagocytes are the main innate immune defense against *Leishmania*, it is possible that miltefosine, beyond its microbicidal effects, favors the better evolution of the disease by improving macrophage functions, and in addition to decreasing the immunopathogenesis of the disease.

Acknowledgement

The authors are grateful to Nelson Pelet Nascimento, Shirley Claudino Couto and José Siqueira for the excellent technical assistance and to Mr. Lucas Souza Kückelhaus for reviewing the English language of the manuscript.

References

- Azzouz, S., Maache, M., Garcia, R.G., Osuna, A., 2005. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 60-65.
- Barratt, G., Saint-Pierre-Chazalet, M., Loiseau, P.M., 2009. Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. *Curr. Drug. Metab.* 10, 247-255.
- Basu, M.K., Ray, M., 2005. Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 145-154.
- Berkovic, D., Wernicke, J.H., Flier, E.A., 2003. Effects of etherlipid analogs on cell membrane functions. *J. Exp. Ther. Oncol.* 3, 185-193.
- Bhattacharya, S.K., Jha, T.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Engel, J., Sindermann, H., Junge, K., Karbwang, J., Bryceson, A.D.M., Berman, J.D., 2004. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin. Infect. Dis.* 38, 217-221.
- Bhattacharya, S.K., Sinha, P.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Jha, T.K., Pandey, K., Das, V.R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V.P., Ranjan, A., Verma, R.B., Anders, G., Sindermann, H., Ganguly, N.K., 2007. Phase 4 trial of miltefosina for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 196,591-598.
- Costa-Filho, A.V., Lucas, I.C., Sampaio, R.N.R., 2008. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 424-427.
- Croft, S.L., Engel, J., 2006. Miltefosine- discovery of the antileishmanial activity of phospholipids derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1, S4-S8.
- Escobar, P., Yardley, V., Croft, S.L., 2001. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), ambisome, and sodium stibogluconate (pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1872-1875.

- Forman, H.J., Torres, M., 2002. Reactive oxygen species and cell signaling respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, S4-S8.
- Garcia, X., Stein, F., 2006. Nitric oxide. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 17, 55-57.
- Geilen, C.C., Wieder, T., Haase, A., Reutter, W., Morr , D.M., Morr , D.J., 1994. Uptake, subcellular distribution and metabolism of the phospholipid analogue hexadecylphosphocholine in MDCK cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1211, 14-22.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.
- Griewank, K., Gazeau, C., Eichhorn, A., Von Stebut E., 2010. Miltefosine efficiently eliminates *Leishmania major* amastigotes from infected murine dendritic cells without altering their immune function. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 652-659.
- Handman, E., Bullen, D.V., 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18, 332-334.
- Hartmann, K., Siebenhaar, F., Belloni, B., Brockow, K., Eben, R., Hartmann, B., Ru ff, F., Schoepke, N., Staubach, P., Weber, A., Maurer, M., 2010. Effects of topical treatment with the raft modulator miltefosine and clobetasol in cutaneous mastocytosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Br. J. Dermatol.* 162, 185-190.
- Hilgard, P., Kampher, E., Nolan, L., Pohl, J., Reissmann, T., 1991. Investigation into the immunological effects of miltefosina, a new anticancer agent under development. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 117, 403-408.
- Hilgard, P., Klenner, T., Stekar, J., Unger, C., 1993. Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32, 90-95.
- Jiménez-López, J.M., Rios-Marco, P., Marco, C., Segovia, J.L., Carrasco, M.P., 2010. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol and antitumor alkylphospholipids. *Lipids Health Dis.* 9, 33.
- Kuhlencord, A., Maniera, T., Eibl, H., Unger, C., 1992. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1630-1634.
- Kuckelhaus, C.S; Kuckelhaus, S.A.S; Muniz-Junqueira, M.I., 2011. Influence of long-term treatment with pravastatin on the survival, evolution of cutaneous lesion and weight of animals infected by *Leishmania amazonensis*. *Exp. Parasitol.* 127, 658-664.

- Lechner, M., Lirk, P., Rieder, J., 2005. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin. Cancer Biol.* 15, 277-289.
- Lira, R., Contreras, L.M., Santa-Rita, R.M, Urbina, J.A., 2001. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 537–546.
- Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., Opperdoes, F.R., 2000. Etherlipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of etherlipid analogues in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 1–14.
- Muniz-Junqueira, M.I., Peçanha, L.M.F., Silva-Filho, V.L., Cardoso, M.C.A., Tosta, C.E., 2003. Novel Microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 1096–1102.
- Muniz-Junqueira, M.I., Silva, F.O., de Paula-Júnior, M.R., Tosta, C.E., 2005. Thalidomide influences the function of macrophages and increases the survival of *Plasmodium berghei*-infected CBA mice. *Acta Trop.* 94, 128–138.
- Muniz-Junqueira, M.I., Karnib, S.R., de Paula-Coelho, V.N., Junqueira, L.F.Jr., 2006. Effects of pravastatin on the in vitro phagocytic function and hydrogen peroxide production by monocytes of healthy individuals. *Int. Immunopharmacol.* 6, 53-60.
- Muniz-Junqueira M.I., de Paula-Coelho V.N., 2008. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1633–1638.
- Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C., Breard, J., 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 852-859.
- Patwardhan, G.A., Liu, Y.Y., 2011. Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. *Prog. Lipid. Res.* 50, 104-114.
- Ponce, J., de la Ossa, N.P., Hurtado, O., Millan, M., Arenillas, J.F., Dávalos, A., Gasull, T., 2008. Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke.* 39, 1269-1275.
- Sane, S.A., Shakya, N., Gupta, S., 2011. Immunomodulatory effect of picroliv on the efficacy of paromomycin and miltefosine in combination in experimental visceral leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 127, 376–381.

- Schraner, C., Hasse B., Hasse U., Baumann D., Faeh A., Burg G., Grimm F., Mathis A., Weber R., Günthard H.F., 2005. Successful Treatment with Miltefosine of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in a Severely Immunocompromised Patient Infected with HIV-1. *Clin. Infect. Dis.* 40(12), e120-e124.
- Shaw, C.A., Taylor, E.L., Fox, S., Megson, I.L., Rossi, A.G., 2011. Differential susceptibility to nitric oxide-evoked apoptosis in human inflammatory cells. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 93-101.
- Soto, J., Rea, J., Balderrama, M., Toledo, J., Soto, P., Valda, L., Berman, J.D., 2008. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 210-211.
- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Engel J., Sindermann H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson A., Berman, J., 2002. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 347,1739-1746.
- Sundar, S., Murray, H.W., 2005. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organization.* 83(5), 394-395.
- Überall, F., Oberhuber, H., Maly, K., Zaknun, J., Demuth, L., Grunicke, H.H., 1991. Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. *Cancer Res.* 51, 807-812.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 825-852.
- Unger, C., Damenz, W., Fleer, E.A., Kim, D.J., Breiser, A., Hilgard, P., Engel, J., Nagel, G., Eibl, H., 1989. Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. *Acta Oncol.* 28, 213-217.
- Verma, N.K., Dey, C.S., 2004. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3010-3015.
- Wadhone, P., Maiti, M., Agarwal, R., Karnat, V., Martin, S., Saha, B., 2009. Miltefosine promotes IFN- γ -Dominated anti-leishmanial immune response. *J. Immunol.* 182, 7146-7154.
- Weller, K., Artuc, M., Jennings, G., Friedrichson, T., Guhl, S., dos Santos, R.V., Sünder, C., Zuberbier, T., Maurer, M., 2009. Miltefosine inhibits human mast cell activation and mediator release both in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 129, 496-498.
- World Health Organization. Leishmaniasis. 2010. [Cited 2010 March 27]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

Zeisig, R., Rudolf, M., Eue, I., Arndt, D., 1995. Influence of hexadecylphosphocholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121, 69-75.

Legends to Figures

Figure 1. Influence of miltefosine on phagocytosis of non-sensitized *S. cerevisiae*, by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice (n=9). Macrophages (2×10^5) were incubated with different concentration of miltefosine (0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of 4×10^6 *S. cerevisiae* per well. Data are expressed as median, quartiles and extremes values. Top: Average number of *S. cerevisiae* ingested by macrophage. Middle: Proportion of macrophages engaged in phagocytosis. Bottom: Phagocytic index. In the bottom panel, the median of phagocytic index of macrophages treated with 50 $\mu\text{g/mL}$ of miltefosine was significantly higher than in the absence of the drug (Wilcoxon), the same result was observed in the middle panel. There was an increase in the percentage of macrophages engaged in phagocytosis when incubated with 50 $\mu\text{g/mL}$ miltefosine ($50 \mu\text{g/mL} > 0 \mu\text{g/mL}$) (Wilcoxon). In the top panel, the number of *S. cerevisiae* ingested by macrophages in the absence of miltefosine was higher than that incubated with 50 $\mu\text{g/mL}$ of the drug ($50 \mu\text{g/mL} < 0$) (Wilcoxon).

Figure 2. Influence of miltefosine on phagocytosis of sensitized *S. cerevisiae*, by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice (n=9). Macrophages (2×10^5) were incubated with different concentration of miltefosine (0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of 4×10^6 *S. cerevisiae* per well. Data are expressed as median, quartiles and extreme values. Top: Average number of *S. cerevisiae* ingested by macrophage. Middle: Proportion of macrophages engaged in phagocytosis. Bottom: Phagocytic index. In the bottom panel, the values of phagocytic index treated with 10 or 50 $\mu\text{g/mL}$ were significantly higher than in the absence of the drug (Wilcoxon). Similar results were observed for the percent of macrophages engaged in phagocytosis (10 and 50 $\mu\text{g/mL} > 0 \mu\text{g/mL}$ (middle) (Wilcoxon) and the number of *S. cerevisiae* ingested by macrophage (10, 50 $> 0 \mu\text{g/mL}$) (Wilcoxon) (Top).

Figure 3. Miltefosine did not influence the production of hydrogen peroxide by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice (n=10). Macrophages (2×10^5) were incubated with different

concentration of miltefosine (0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the absence (top) or presence (bottom) of concomitant stimulus with PMA. Data are expressed as mean \pm SD. Pair-wised t test $p>0.05$.

Figure 4. Influence of miltefosine on the production of nitric oxide by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice (n=10). Macrophages (2×10^5) were incubated with different concentration of miltefosine (0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the absence (top) or presence (bottom) of concomitant stimulus with LPS. The data are expressed as mean \pm SD. Results, analyzed by pared t test, showed that all concentration of miltefosine (10, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) decreased the baseline or stimulated production of nitric oxide (10, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ < 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($p<0.001$, t test).

Figure 1

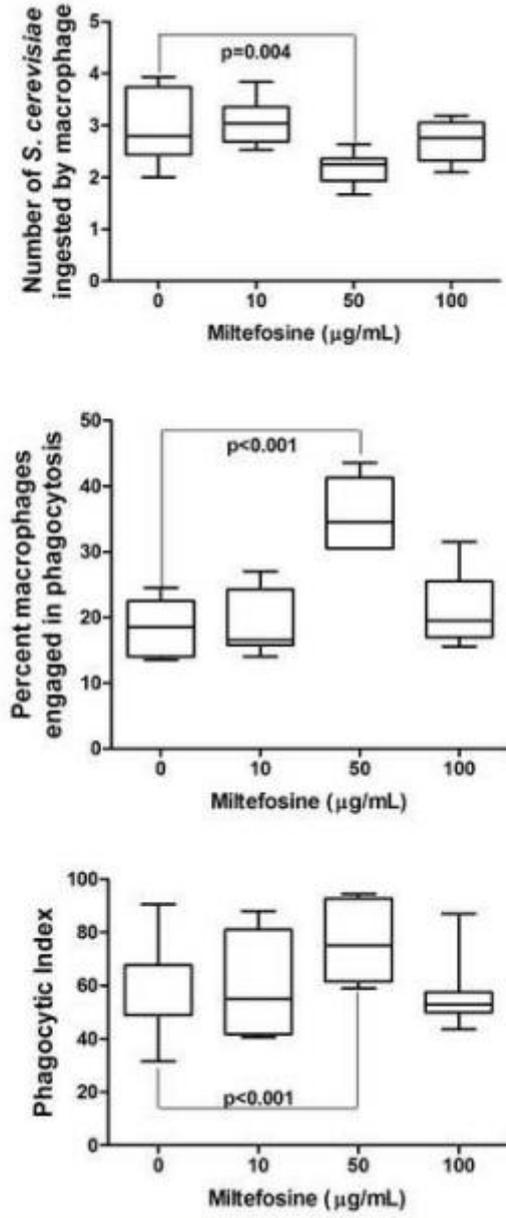


Figure 2

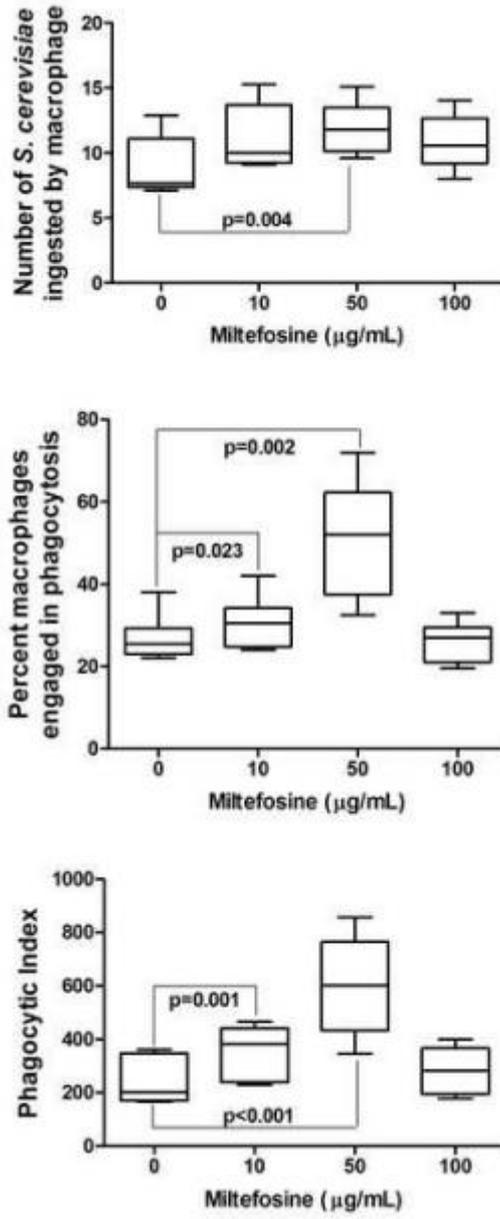


Figure 3

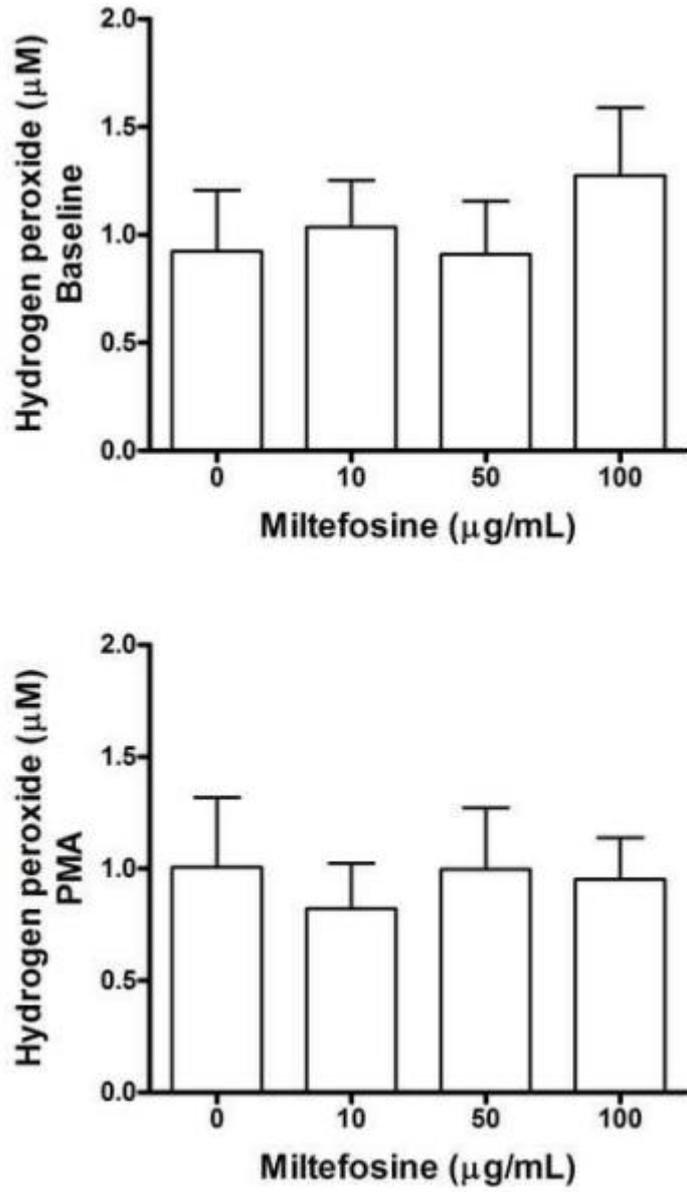


Figure 4

