

## TESTES *IN VIVO* COM FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EXPERIMENTAL

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

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

### 1. Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, não contagiosa, de transmissão vetorial e causada por protozoário do gênero *Leishmania*. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Gontijo *et al.* 2003).

A Leishmaniose Tegumentar constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos (Brasil 2010). No Brasil, observa-se uma expansão geográfica dessa enfermidade. No período de 1980 a 2004, a LTA apresentou coeficientes de detecção com tendência ao crescimento, que oscilaram entre 3,8 e 22,9 por 100.000 habitantes (Nasser *et al.* 2009). Os fármacos utilizados como terapêutica para o tratamento da leishmaniose tegumentar apresenta uma série de problemas, incluindo resistência do parasito, indução de efeitos colaterais e abandono dos pacientes por serem medicamentos de administração parenteral (Silva-López 2010).

Com o objetivo de desenvolver drogas mais eficazes, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para com os pacientes, o estudo em pauta refere-se ao desenvolvimento e aplicação de formulações tópicas contendo *Libidibia ferrea*, que indiquem uma maior atividade Leishmanicida e formulações com óleos vegetais e contendo drogas padrões por ensaios *in vivo*, tendo como modelo animal experimental hamsters infectados com parasitos do gênero *Leishmania*. Assim, este estudo possibilitou acompanhar a evolução morfológica das lesões causada pelo parasito e a viabilidade dos parasitos durante e após tratamento tópico com novas formulações de uso tópico.

### 2. Material e Métodos

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

**Animais experimentais** - O modelo biológico experimental para o estudo foram 24 hamsters (*Mesocricetus auratus*) adultos (acima de 90 dias), fêmeas e machos e pesando equivalente a 60g. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e o procedimento para o tratamento dos animais infectados ocorreu nas dependências do Biotério do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, CSAS – INPA. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno em condições adequadas a sua manutenção, com dieta e água *ad libitum*. O projeto foi submetido à comissão de ética dos animais, possuindo o número de protocolo 011/2012.

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

O delineamento para a avaliação biológica foi determinado em experimentação I e II, os quais continham dois grupos recebendo tratamento e um grupo controle negativo para cada experimentação, levando em consideração que em cada grupo havia quatro animais.

As formulações utilizadas continham extratos de *L. ferrea*, (Gel 02), óleos vegetais (ACU02), ou Antimônio sb (creme 01 e 03), em fórmulas anídras.

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

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

Foram recolhidos segmentos da área da lesão para fixação e armazenamento para microscopia eletrônica e criopreservação em nitrogênio líquido. Outros segmentos foram utilizados para impressão por aposição em lâmina e semeados em meio RPMI completo para determinação da viabilidade parasitária.

As lâminas foram fixadas com metanol e em seguida, coradas pelo método de Giemsa para quantificação parasitária em três campos para cada lâmina através do uso do Microscópio óptico.

Após os tratamentos, os dados registrados foram digitados em um banco de dados previamente elaborado no programa Minitab versão 15 e em seguida, analisados estatisticamente através de teste Análise de Variância (ANOVA), utilizando limite de 95% de confiança.

### 3. Resultados e Discussão

Todos os grupos das experimentações que tiveram recolhimento de segmentos das lesões e semeados em meio RPMI apresentaram viabilidade parasitária para infecção de Leishmaniose.

As médias de parasitos por campo no experimento foram calculadas através do teste ANOVA e obteve uma significância estatística ( $p < 0,05$ ) com o valor de  $p$  igual 0,014. Na figura 01 foi possível observar que o ACU 2 obteve melhor resultado ao ser comparado com as médias de parasito/campo do grupo controle. Não foi observado resultado satisfatório com as médias do grupo Gel 2, devido ser superior ao do grupo controle.

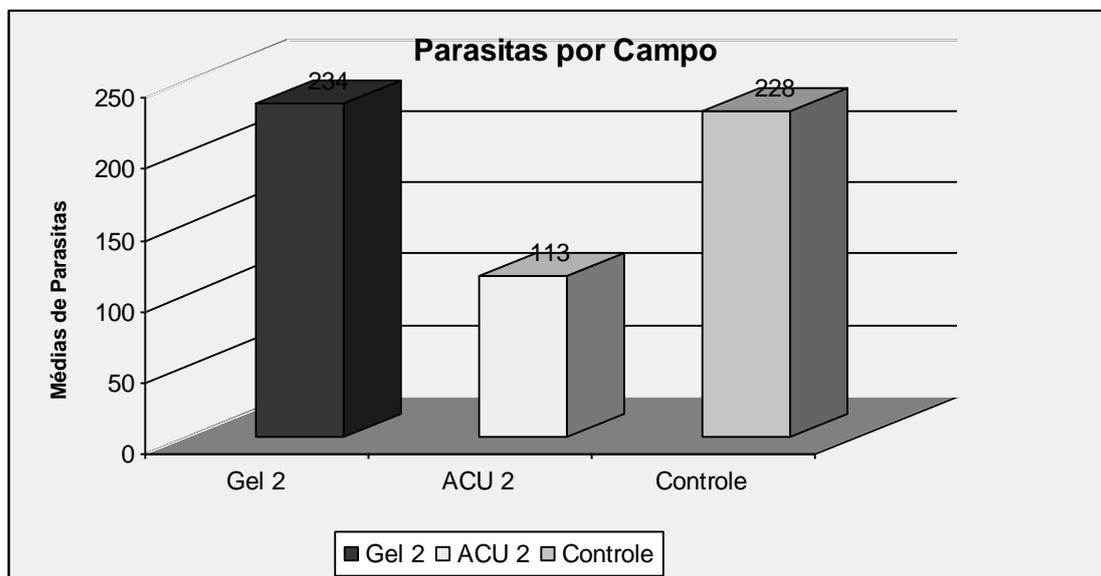


Figura 01. Médias de parasitos por campo das lâminas do experimento I.

O estudo ANOVA realizado para calcular as médias de parasitos por campo no experimento II, demonstrou significância estatística ( $p < 0,05$ ) em que o  $p$  foi equivalente a 0,035. Na figura 02 observou-se que as médias de parasitos por campo do grupo que recebeu tratamento com creme 1 obteve menor número do que a do creme 3, encontrando um número de parasitos em maior concentração ao comparar-se com o grupo controle, verificando que mesmo com ausência de tratamento demonstrou a menor média de parasitos.

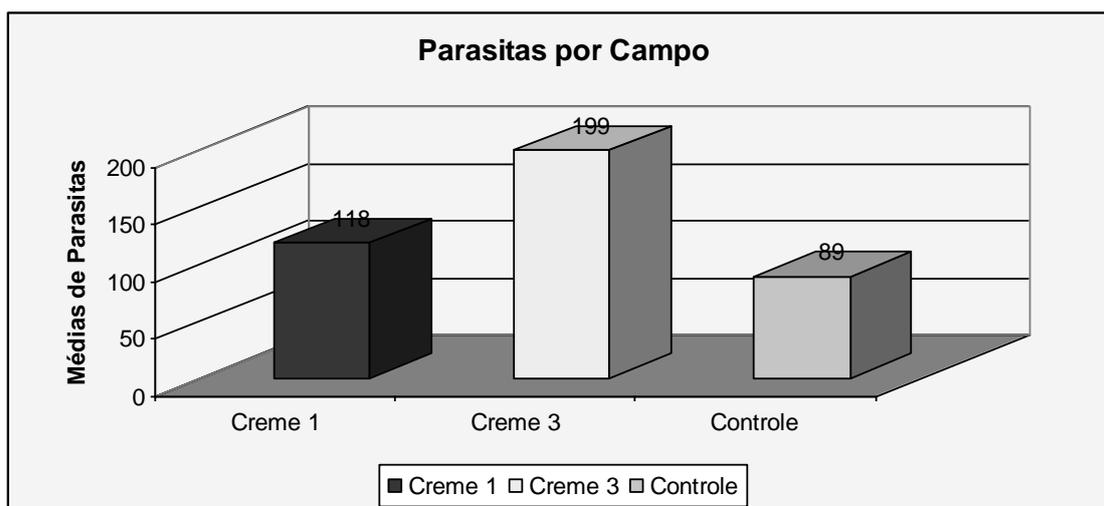


Figura 02. Médias de parasitos por campo das lâminas do experimento II.

De acordo com o teste ANOVA foi possível calcular as médias e observar que houve significância estatística ( $p < 0,05$ ), em que no primeiro experimento  $p$  foi equivalente a 0,030. Analisando a figura 03 verificou-se que o primeiro grupo (Gel 02) que recebeu tratamento com formulação I, até o quarto dia as

lesões mantiveram-se em crescimento, mas do quinto dia ao décimo houve um controle do crescimento das lesões, porém nos dias consecutivos as lesões obtiveram um crescimento gradativo, havendo certa dissonância ao compará-lo com o grupo controle que demonstrou um crescimento constante até o vigésimo segundo dia de tratamento, porém os dias seguintes houve uma oscilação. O último grupo (ACU 02) que recebeu tratamento com a formulação II obteve um resultado mais significativo, durante os primeiros dez dias, as lesões não cresceram consideravelmente, mas os seguintes dias houve um crescimento constante e exacerbação das lesões.

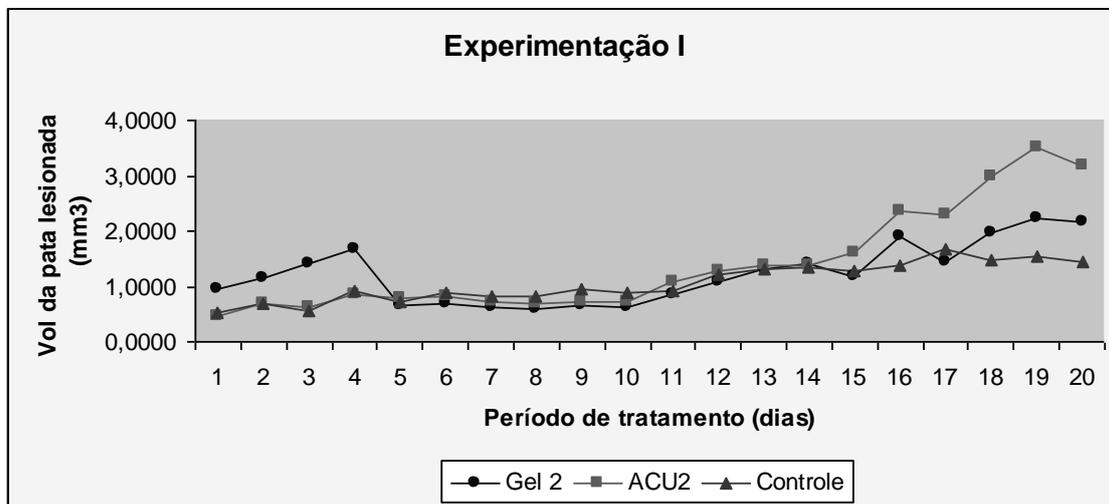


Figura 03. Variação das médias do volume das lesões em grupo durante o tratamento I.

O experimento II também apresentou significância estatística ( $p < 0,05$ ) o qual o p foi respectivamente a 0,005. Analisando a figura 04 observou-se que o grupo que recebeu tratamento com a formulação - Creme 1 obteve um resultado significativo, em que até o sétimo dia de tratamento as lesões não apresentaram oscilações relevantes, somente no décimo ao último dia de tratamento, pois houve uma redução no tamanho das lesões. Foi possível comparar com o grupo controle, o qual as lesões cresceram gradativamente até o quinto dia, a partir do décimo dia houve um crescimento nas lesões consideravelmente. O último grupo que recebeu tratamento com a formulação - creme 3, obteve um resultado discrepante aos outros grupos, pois até o terceiro dia as lesões tiveram um crescimento contínuo, posteriormente apresentaram uma redução no tamanho das lesões até o sexto dia, em seguida as lesões desenvolveram-se com um tamanho relevante e oscilando durante o resto do tratamento.

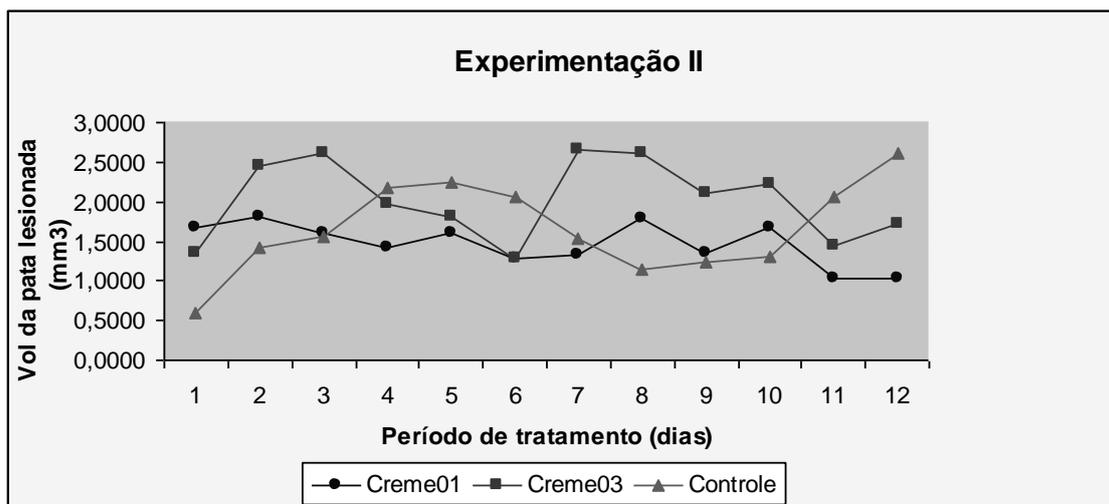


Figura 04. Variação das médias do volume das lesões em grupo durante o tratamento II.

Levando em consideração que o Gel 02 contendo extrato do epicarpo de *L. ferrea* no qual possui estudos que demonstram efeito significativo na cicatrização das lesões, como já referenciado em estudos com caprinos (Oliveira *et al.* 2010), o Gel ACU 02 e o creme 1 aplicado na segunda experimentação apresentaram melhor resultado com o menor número de médias de parasitos por campo, sugerimos que

estas formulações necessitam ser reformuladas com o intuito de obter uma concentração mais efetiva assim como uma maior eficácia quanto a sua melhor absorção e efetiva morte parasitária.

#### 4. Conclusão

Apesar dos resultados relevantes, ainda surge à necessidade do aperfeiçoamento de uma formulação contendo uma ou mais substâncias bioativas que venham contribuir para um tratamento mais eficaz e com menores efeitos colaterais.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Brasil. 2010. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde. 180pp.
- Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1): 71-80.
- Nasser, J.T.; Donalizio, M.R.; Vasconcelos, C.H. 2009. Distribuição espacial de casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas, Estado de São Paulo, no período de 1992 a 2003. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(3): 309-314.
- Oliveira, A.F.; Batista, J.S.; Paiva, E.S.; Silva, A.E.; Farias, Y.J.M.D.; Damasceno, C.A.R.; Brito, P.D.; Queiroz, S.A.C.; Rodrigues, C.M.F.; Freitas, C.I.A. 2010. Avaliação da atividade cicatrizante do Jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(3): 302-310.
- Silva-López, R.E. 2010. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova*, 33: 1541-1543.