

Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Arnoldo Velloso da Costa Filho¹, Íris Campos Lucas¹ e Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio¹

RESUMO

Vinte e cinco camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina e miltefosina oral. Critérios: medidas das patas, pesquisa de amastigotas e culturas após-tratamento. Miltefosina: 2,43mm e glucamina 3,46mm ($p=0,05$). Miltefosina: esfregaços e culturas negativos. Glucamina: 2 esfregaços positivos e culturas positivas ($p<0,05$). Concluímos que miltefosina foi semelhante à glucamina.

Palavras-chaves: Miltefosina. Leishmaniose cutânea. Leishmaniose cutânea. Terapia.

ABSTRACT

Twenty-five mice were infected with *Leishmania amazonensis* and treated with glucamine and oral miltefosine. The criteria used were pad measurements and investigations of amastigotes and cultures after treatment. Measurements: miltefosine 2.43 mm and glucamine 3.46 mm ($p: 0.05$). Miltefosine smears and cultures were negative. Glucamine produced two positive smears and the cultures were positive ($p < 0.05$). Miltefosine was similar to or better than glucamine.

Key-words: Miltefosine. Cutaneous leishmaniasis. Cutaneous leishmaniasis. Therapy.

O tratamento de primeira escolha da leishmaniose cutâneo-mucosa é o antimoniato de N-metil-glucamina que administrado por via parenteral apresenta toxicidade elevada e é ineficaz em muitos casos^{14 15}. Outras medicações como a anfotericina B e a pentamidina apresentam desvantagens similares. Portanto, a toxicidade e o índice de recidivas e resistência às drogas justificam a busca de novas drogas para tratar a leishmaniose tegumentar^{1 2 4 12 14 15}. A miltefosina (hexadecilfosfocolina), medicamento originalmente desenvolvido como antineoplásico, tem ação eficaz sobre as leishmânias^{5 7 8 9 16 18 19 20 22}. Esta droga age interferindo na membrana celular do parasita, sem interagir com o DNA, depois modula a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolípidos, induzindo morte celular por apoptose^{11 22}.

Tem sido testada com bons resultados *in vitro*, em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani*, desde 1987^{3 11 22} e a partir de 1992, *in vivo*, na leishmaniose visceral

experimental. A partir de 2005 foi testado, *in vitro*, em formas promastigotas de *Leishmania (Vianna) braziliensis* e *Leishmania (Vianna) guyanensis*. Mais recentemente foram testadas *in vitro* formas amastigotas nas principais espécies de interesse para o nosso país (*Leishmania (Leishmania) cbagasi*, *Leishmania (Vianna) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Vianna) guyanensis*) com demonstração de ação sobre as mesmas (EM Teixeira, MK Galuppo, FO Silva, QS Damasceno, AJ Romanha, A Rabello: dados não publicados).

Tendo em vista a importância das leishmanioses e as dificuldades envolvidas em seus tratamentos, tais como resistência aos antimoniais, a miltefosina surgiu como um medicamento promissor para o tratamento da leishmaniose tegumentar, sendo administrado por via oral e com menos efeitos colaterais, chegando a ser registrado na Índia para o tratamento da leishmaniose visceral (calazar) em 2002²¹.

O objetivo do atual projeto foi estudar e comparar a eficácia da miltefosina oral no tratamento da leishmaniose experimental

1. Laboratório de Dermatocologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF

Apoio financeiro parcial: FINATEC (093/2007)

Endereço para correspondência: Dra. Raimunda N.R. Sampaio. SHIS QI 25, conj. 02, casa 01, 71660-220 Brasília, DF.

Tel/Fax: 55 61 3367-3825

e-mail: rsampaio@unb.br

Recebido para publicação em 7/2/2008

Aceito em 25/08/2008

causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, com a droga de primeira escolha usada atualmente, antimoniato de N-metil-glucamina.

Os animais usados foram camundongos isogênicos, sexo masculino, cepa C57BL/6. Os parasitas foram identificados como *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, por isoenzimas e anticorpos monoclonais específicos e mantidos em nitrogênio líquido no Laboratório de Dermatômologia da Faculdade de Medicina (UnB) onde foram descritos preservados.

Os parasitas (*Leishmania (Leishmania) amazonensis*) foram submetidos à curva de crescimento. O número de parasitas foi quantificado em intervalos de 24 horas por sete dias consecutivos, e a contagem sempre foi realizada no mesmo horário. O objetivo da curva foi avaliar o crescimento dos parasitas da fase log, na qual ocorre maior presença de formas promastigotas pró-cíclicas, até o início da fase estacionária, considerada mais infectante devido a maior concentração de formas promastigotas metacíclicas.

Depois disto, foram inoculados 25 camundongos no coxim plantar direito, com 3×10^6 promastigotas metacíclicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Os animais foram acompanhados para registrar o aparecimento das lesões cutâneas, quando então, foi iniciado o tratamento (no final da terceira semana). Estes foram divididos de maneira aleatória em dois grupos: 10 animais foram tratados com N-metil-glucamina 400mgSbV/kg/dia, via intramuscular durante 20 dias e 15 animais foram tratados com miltefosina 20mg/kg/dia durante 20 dias, via oral por gavagem. A droga miltefosina foi doada pela indústria farmacêutica Zentaris.

Após o término do tratamento os animais foram avaliados por critério clínico e parasitológico.

O critério clínico consistiu na medição do coxim plantar inoculado, por meio de um paquímetro com precisão de décimos de milímetro, após o tratamento.

O critério parasitológico foi realizado usando amostras extraídas, por punção das patas inoculadas dos animais para a realização de pesquisa de amastigotas em esfregaços corados pelo Giemsa, culturas no meio bifásico NNN (Nove-McNeal-Nicolle) e culturas em diluições limitantes. As leituras das lâminas e culturas foram realizadas pelos estudantes responsáveis pela execução do projeto, supervisionados por técnico do Laboratório de Dermatômologia.

A diluição limitante visou estipular a quantidade aproximada de amastigotas viáveis na pata do animal⁶. Para isto realizou-se a dissecação asséptica da pata de um animal de cada grupo, fez-se a sua trituração em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) com soro bovino fetal, seguida de 96 culturas em placas tipo ELISA fundo chato, 96 poços em sucessivas diluições de 10 vezes. Os resultados, em números, obtidos a partir da contagem dos poços nos quais houve crescimento de promastigotas de leishmânia, em um período de uma a duas semanas, deveriam ser registrados no *software* ELIDA[®] para a análise estatística.

A análise estatística dos demais resultados (diâmetros das patas, pesquisa de amastigotas e culturas tradicionais) foi realizada pelo módulo STATCALC do programa *Epi Info* 6.04.

Após o tratamento, o grupo miltefosina apresentou média das medidas das patas dos camundongos 2,43mm (desvio padrão: 0,05) e o grupo antimoniato de N-metil glucamina 3,46mm (desvio padrão 0,02). Estes dados foram analisados pelo teste *t de Student* [$t(1): 1,086, p: 0.05$].

Nos resultados da pesquisa de amastigotas através dos esfregaços realizados em material colhido das patas dos camundongos, após o tratamento, o grupo miltefosina teve todos os resultados negativos, enquanto o grupo N-metil glucamina teve duas pesquisas de amastigotas positivas. Os dados foram analisados pelos testes qui-quadrado e Fischer que apresentaram valor de *alpha* maior que 0,05 (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado da pesquisa de amastigotas nos esfregaços após tratamento, nos grupos de camundongos tratados com miltefosina 20mg/kg/dia durante 20 dias, via oral e antimoniato de N-Metil-glucamina 400mgSbV/kg/dia via IM, durante 20 dias.

Grupos	Pesquisa de amastigotas		
	positiva (n ^o)	negativa (n ^o)	total (n ^o)
Miltefosina	0	10	10
N-metil glucamina	2	8	10
Total	2	18	20

$\chi^2: 2,22, p: 0,1462$ Fischer: -1, $p: 0,2368$ n^o: número

Nos resultados das culturas para leishmânia realizadas após o tratamento, em meio sólido NNN, o grupo miltefosina teve todas as culturas negativas e o grupo N-metil glucamina teve todas as culturas positivas ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultado das culturas de leishmânia após tratamento, nos grupos de camundongos tratados com miltefosina 20mg/kg/dia durante 20 dias, via oral e antimoniato de N-Metil-glucamina 400mg SbV/kg/dia via IM, durante 20 dias

Grupos	Culturas		
	positiva (10)	negativa (10)	total (20)
Miltefosina	0	10	10
N-Metil glucamina	10	0	10
Total	10	10	20

$\chi^2: 20, p: 0,000$

Na avaliação das 96 culturas realizadas em meio líquido (RPMI) em diluições limitantes em placas tipo ELISA, para cada grupo, não houve crescimento de leishmânias nas culturas de ambas as placas.

Registrou-se a morte de cinco animais no grupo tratado com miltefosina. A mortalidade, neste grupo, pode ter sido causada pelo método de gavagem, usado para administrar a droga, por expor o animal a maior risco de asfixia.

Após o tratamento, o grupo miltefosina apresentou média das medidas das patas posteriores 2,43mm (desvio padrão: 0,05) ao grupo N-metil glucamina 3,46mm (desvio padrão 0,02), o que pode ser interpretado como sendo causada pela maior regressão do infiltrado celular após o tratamento, fato levado em conta nos critérios de cura clínica da leishmaniose cutânea. Entretanto não houve diferença estatística significativa, não podendo isto ser totalmente valorizado.

Quanto aos esfregaços, não houve também, diferença significativa entre os resultados dos dois grupos, entretanto observa-se que no grupo N-metil glucamina teve ainda presença de amastigotas após o tratamento, mostrando certa desvantagem em relação ao grupo miltefosina que apresentou todas as pesquisas de amastigotas negativas.

Já em relação às culturas, houve diferença significativa, com resultado favorável ao grupo miltefosina que teve todas as culturas negativas, em detrimento ao grupo N-metil glucamina que teve todas as culturas positivas após tratamento. Quanto à discordância entre a negatividade da pesquisa de amastigotas em relação à positividade das culturas, sem dúvida a leitura das culturas é mais fácil porque requer menor habilidade técnica. Também, a cultura de leishmânia tem mais alto percentual de positividade que a pesquisa de amastigotas em esfregaço, e o achado de DNA de leishmânia, em cicatrizes de pacientes tratados com antimonial, é referido na literatura¹⁷.

Não foi possível avaliar os resultados da diluição limitante realizada em placa de ELISA, já que tanto no grupo N-metil glucamina quanto no grupo da miltefosina não houve crescimento das leishmânias. Como não houve contaminação por bactérias ou fungos, algo que poderia justificar este achado seria cogitar que o meio de cultura líquido RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) não tivesse funcionado adequadamente, se comportando diferente do meio NNN (sólido) usado para realizar as culturas em tubos.

O grupo miltefosina apresentou resultados melhores quanto ao seu tratamento, constatados pela pesquisa de amastigotas nos esfregaços onde não foi encontrada nenhuma forma amastigota e nas culturas em meio NNN nas quais não houve crescimento de leishmânias, esta com diferença significativa em relação ao grupo N-metil glucamina.

Usou-se o critério clínico como auxiliar na avaliação de cura, mas sem dúvida o critério parasitológico é o método de grande força, principalmente a avaliação de culturas pelo método da diluição limitante que infelizmente falhou neste experimento. Nesta avaliação pretendeu-se comparar a eficácia entre uma droga e outra e não avaliar se o animal estava parasitologicamente curado.

Há mais de 20 anos, a miltefosina vem sendo testada e demonstrada sua eficácia na destruição da *Leishmania donovani*^{11 22}. Só há 3 anos vem sendo testada *in vitro* em espécies que interessam ao nosso país. Este trabalho estuda esta droga, pela primeira vez, na leishmaniose cutânea experimental causada por espécie de interesse ao país, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* que normalmente se manifesta por lesões ulceradas únicas na pele e excepcionalmente causa a leishmaniose cutânea difusa que se manifesta com lesões nodulares exuberantes e se caracteriza por não curar com as drogas específicas para a doença.

Considerando que a miltefosina apresenta menor toxicidade e maior facilidade de administração que o N-metil glucamina por ser usada por via oral, o seu uso seria muito vantajoso na leishmaniose^{10 13}. A importância de uma droga de uso oral e efetiva contra a leishmaniose se destaca pelo fato de ser essa doença mais prevalente em regiões mais pobres e de difícil acesso no Brasil, tais como regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste onde seria de imensa valia e aumentaria enormemente a adesão ao tratamento.

Entretanto, um efeito adverso que deve ser considerado é o potencial efeito teratogênico da miltefosina, devendo por isso, ser usada com muita cautela em mulheres em idade fértil^{13 18}, necessitando sempre de uso concomitante de método anticoncepcional.

Conclui-se que a miltefosina mostrou eficácia semelhante, senão maior que o N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea experimental causada por *Leishmania amazonensis* em camundongos. Esse resultado demonstra a possibilidade de sua experimentação, em ensaios clínicos, no tratamento da doença humana no Brasil, assim como a demonstração da eficácia no tratamento *in vivo* de outras espécies de leishmânia que causam a forma cutânea nas Américas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao senhor Tercio Rodrigues Pereira e à Zentaris.

REFERÊNCIAS

1. Aebischer T. Recurrent Cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites? *Parasitology Today* 10: 25-28, 1994.
2. Belliard AM, Leroy C, Banide H, Farinotti R, Lacour B. Decrease of intestinal P-glycoprotein activity by 2n-propylquinoline, a new oral treatment for visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 103: 51-56, 2003.
3. Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology* 36: 2633-2636, 1987.
4. Guevara P, Rojas E, Gonzalez N, Scorza V, Añez N, Valera M. Presence of *Leishmania braziliensis* in Blood Samples from Cured Patients or at Different Stages of Immunotherapy. *Clinical Diagnosis Laboratory Immunology* 1: 385-389, 1994.
5. Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 36: 1630-1634, 1992.
6. Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus RG. A Simple Method for Quantifying *Leishmania* in Tissues of Infected Animals. *Parasitology Today* 13:80-82, 1997.
7. Mohebbi M, Fotouhi A, Hooshmand B, Zarei Z, Akhouni B, Rahnama A, Razaghian A R, Kabir M J, Nadim A. comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. *Acta Tropica* 103: 33-40, 2007
8. More B, Bhatt H, Kukreja V, Ainapure S. Miltefosine: great expectations against visceral leishmaniasis. *Journal Postgraduate Medical* 49: 101-103, 2003.
9. Murray H. Suppression of posttreatment recurrence of experimental visceral Leishmaniasis in t-cell-deficient mice by oral miltefosine. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44: 3235-3236, 2000.
10. Murray H, Delph-Etienne S. Visceral leishmanicidal activity for hexadecylphosphocholine in mice deficient in T Cells and activates macrophage microbicidas mechanisms. *American Journal of Infectious Disease* 181: 795-799, 2000.
11. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 852-859, 2004
12. Ponte-Sucre A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biological Disease* 2: 14, 2003.
13. Prasad R, Kumar R, Jaiswal P, Singh K. Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. *Indian Journal Pediatrics* 71: 143-144, 2004.

14. Sampaio RNR, Marsden PD, Furtado T, Sampaio JHD. Avaliação do tratamento da leishmaniose cutâneo-mucosa com três esquemas diferentes de antimoniais pentavalentes. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 64: 201-205, 1989.
15. Sampaio RNR, Sampaio JHD, Marsden PD. Pentavalent antimonial treatment in mucosal leishmaniasis. *Lancet* 1: 1097, 1985.
16. Schimdt-Ott R, Klenner T, Overath P, Aebischer T. Topical treatment with hexadecylphosphocoline efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 85-90, 1999.
17. Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi JG, Fernandes O. Detection of *Leishmania* DNA by the polymerase chain reaction in scars of treated human cases. *Journal of Infectious Diseases* 178: 911-914, 1998.
18. Seiferd K, Croft L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50: 73-79, 2006.
19. Sindermann H, Croft L, Engel KR, Bommer W, Eibl J, Unger C, Engel J. Miltefosine (Impavido®): the first oral treatment against leishmaniasis. *Medical Microbiology Immunology* 193: 173-180, 2004.
20. Sindermann H, Engel KR, Fischer C, Bommer W. Miltefosine Compassionate use Program. Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. *Clinical Infectious Diseases* 39: 1520-1523, 2004.
21. Soto J, Toledo JT. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases* 7: 7-7, 2007.
22. Verma K, Dey C. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 48: 3010-3015, 2004.