

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação da atividade de fármacos isolados e em associação sobre  
*Leishmania* de importância médica no Brasil

por

Eliane de Moraes Teixeira

Belo Horizonte  
Fevereiro/2009

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação da atividade de fármacos isolados e em associação sobre  
*Leishmania* de importância médica no Brasil

por

Eliane de Moraes Teixeira

Tese apresentada com vista à  
obtenção do título de doutor em  
Ciências na área de concentração de  
Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Ana Rabello

Co-orientação: Dr. Álvaro Romanha

Belo Horizonte

Fevereiro/2009

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

T266a      Teixeira, Eliane de Moraes.  
2009

Avaliação da atividade de fármacos isolados e em associação, sobre *Leishmania* de importância médica no Brasil, ou, Evaluation of the activity of drugs, isolated and in association, on *Leishmania* of medical importance in Brazil / Eliane de Moraes Teixeira. – Belo Horizonte, 2009.

xviii, 86 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 86 - 104

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose/quimioterapia      2. *Leishmania*/parasitologia  
3. Medicamentos Genéricos/uso terapêutico  
4. Combinação de Medicamentos I. Título. II. Rabello, Ana (Orientação). III. Romanha, Alvaro (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação da atividade de fármacos isolados e em associação sobre  
*Leishmania* de importância médica no Brasil

por

Eliane de Moraes Teixeira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Jorge C.S da Costa (Presidente)

Prof. Dr. Luiz Carlos Crocco

Prof.Dr. Naftale Katz

Prof. Dra. Ana Paula Salle Moura Fernandes

Suplente: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Tese defendida e aprovada em: 20/02/2009

Às pessoas que se dedicam a melhorar a saúde do País.

## **Agradecimentos**

- Agradeço a orientadora Ana Rabello agradeço a oportunidade, a confiança no meu trabalho, a contribuição para minha formação científica e a paciência de esperar pelo meu tempo. Através da sua serenidade, aprendi com você muito mais do que desenvolver e pensar um trabalho científico. Foi um prazer fazer parte da sua equipe.
- Ao co-orientador Álvaro Romanha por atender-me sempre que foi necessário e pela ajuda no entendimento do protocolo da associação dos fármacos.
- Às estudantes de Iniciação Científica que fizeram parte deste trabalho: Mariana Kollos Gualupo e Késia Souza Damasceno meu agradecimento.
- A todos do Laboratório de Pesquisas Clínicas: Zélia, Fernanda, Luciana Gomes, Vanessa, Edward, Karina, Juliana, Thaís, Letícia, Flávia, Gustavo, Daniela, Nádia, Fabiana e Priscila pelo apoio e boa convivência.
- Tive o privilégio de conhecer durante o doutorado, Tália Santana Machado de Assis que esteve comigo em todas as etapas. Agradeço por sua amizade, por sua franqueza, pela boa conversa e por seu incentivo.
- Aos pesquisadores: Alcione Carvalho, Jorge Costa, Silvio Duarte, Jorge Mendonça e Núbia Boechat por confiar a nós a tarefa de avaliar a atividade dos lotes de antimoniato de meglumina sintetizados por Famanguinhos-Fiocruz e ao Dr. Lucas Ferreira pela colaboração.
- Ao Centro de Pesquisas René Rachou e à Pós-graduação do Curso de Ciências da Saúde e às agências de fomento Fapemig, CNPq e à Fiocruz.
- Meu eterno agradecimento aos meus queridos tios Maria Auxiliadora, Luiz Carlos, Maria de Lourdes, Célia e Carlos, à prima Bárbara, meus pais, irmãs e a Isaac.
- Aos membros da banca (Dr. Jorge, Dr. Luiz Coccro, Dr. Naftale, Dra. Ana Paula e Dra. Silvane) pela disponibilidade e avaliação deste trabalho.

- À biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

## Sumário

Lista de figuras .....	xi
Lista de tabelas .....	xii
Lista de abreviaturas e símbolos .....	xiii
Resumo .....	xv
Abstract .....	xvii
1 Introdução .....	19
1.1 Antimoniais pentavalentes .....	20
1.2 Anfotericina B .....	24
1.3 Miltefosina .....	26
1.4 Paromomicina .....	28
1.5 Azitromicina .....	31
1.6 Outros fármacos com atividade leishmanicida .....	33
1.6.1 Pentamidina .....	33
1.6.2 Alopurinol .....	34
1.6.3 Sitamaquina (WR6026) .....	35
1.6.4 Antifúngicos azólicos .....	35
1.6.5 Produtos naturais .....	36
1.7 Associação de fármacos leishmanicidas .....	36
2 Objetivos .....	41
2.1 Objetivo Geral .....	41
2.2 Objetivos específicos .....	41
3 Metodologia .....	42
3.1 Parasitos e manutenção das cepas .....	42
3.2 Fármacos .....	43
3.3 Obtenção de formas amastigota-like de <i>Leishmania</i> .....	43
3.4 Ensaio leishmanicida em modelo de cultivo de amastigota-like para <i>L. chagasi</i> e <i>L. amazonensis</i> .....	44
3.5 Avaliação da atividade leishmanicida dos fármacos sobre <i>Leishmania</i> infectando macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c .....	45
3.5.1 Obtenção de macrófagos .....	45
3.5.2 Infecção de macrófagos e ensaio leishmanicida .....	45
3.6 Ensaio de citotoxicidade da miltefosina para macrófagos murinos .....	46



3.7 Determinação <i>in vitro</i> da associação entre o sulfato de paromomicina e outros fármacos sobre <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> .....	47
3.7.1 Avaliação do sinergismo .....	47
3.7.2 Determinação do índice da concentração fracionada inibitória (CFI) .....	48
3.8 Avaliação <i>in vivo</i> dos lotes de antimoniato de meglumina sintetizados por Farmanguinhos (TAMs) em hamsters infectados com <i>L. braziliensis</i> .....	48
3.9 Análise dos dados .....	49
4 Resultados .....	50
4.1 Avaliação da atividade biológica do antimoniato pentavalente produzido por Farmanguinhos-Fiocruz com fármaco referência Glucantime®-Aventis .....	50
4.1.2 Atividade leishmanicida dos quatro lotes de TAMs usando o modelo amastigota-like .....	50
4.1.3 Atividade leishmanicida das TAMs, usando o modelo de macrófagos infectados por amastigotas .....	52
4.1.4 Atividade leishmanicida <i>in vivo</i> das TAMs e do Glucantime®-Aventis, utilizando hamsters infectados com <i>L. braziliensis</i> .....	53
4.2 Atividade leishmanicida da miltefosina em macrófagos infectados por amastigotas de <i>Leishmania</i> .....	55
4.3 Associação <i>in vitro</i> da paromomicina e outros fármacos sobre amastigotas intracelular de macrófagos peritoneais .....	56
4.3.1 Concentrações inibitórias de 50% e 90% determinados para os fármacos avaliados isoladamente .....	56
4.3.2 Associações <i>in vitro</i> dos fármacos contra amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais de camundogno Balb/c .....	58
5 Discussão .....	64
5.1 Atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do antimoniato de meglumina sintetizado por Farmanguinhos-Fiocruz, Brasil, contra <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. chagasi</i> e <i>L. braziliensis</i> .....	64
5.2 Atividade <i>in vitro</i> da miltefosina contra <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> .....	67
5.3 Associações <i>in vitro</i> entre o sulfato de paromomicina e outros fármacos determinados para <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> .....	70
6 Conclusões .....	74
7 Anexos .....	75

7.1	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) determinadas para cada proporção – diluição empregadas nos ensaios de associação de amastigotas intracelulares entre a paromomicina e outros fármacos sobre <i>L. braziliensis</i> .....	75
7.2	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) determinadas para cada proporção – diluição empregadas nos ensaios de associação de amastigotas intracelulares entre a paromomicina e outros fármacos sobre <i>L. chagasi</i> .....	78
7.3	Artigo publicado.....	81
8	Referências Bibliográficas .....	86

## Lista de figuras

Figura 1- Atividade do antimoniato de meglumina glucantime®-Aventis (glu®) e dos quatro lotes de Farmanguinhos-Fiocruz (TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03 e TAM 021/02) contra formas amastigota-like de <i>L. chagasi</i> (A) e <i>L. amazonensis</i> (B).....	51
Figura 2- Avaliação da atividade do antimoniato de meglumina em hamsters machos ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) infectados com <i>L. braziliensis</i> .....	54

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Concentrações inibitórias (CI <sub>50</sub> ) do Glucantime®-Aventis e do antimoniato de meglumina (lote TAM 01/03) sintetizado por Farmanguinhos-Fiocruz observadas em ensaios de amastigota intracelular para três espécies de <i>Leishmania</i> .....	52
Tabela 2 - Concentrações inibitórias (CI <sub>50</sub> e CI <sub>90</sub> ) da miltefosina sobre diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .....	55
Tabela 3 - Concentrações inibitórias (CI) de 50% e 90% (µg/mL) após três, cinco e sete dias de exposição aos fármacos, determinados nos ensaios <i>in vitro</i> de macrófagos murinos infectados com amastigota-like de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> e tratados com Glucantime®-Aventis (Glu), miltefosina (Milt), paromomicina (PA), desoxicolato de anfotericina B (Anf B) e azitromicina (Azi).....	57
Tabela 4 - Valores das CI de 50% e 90% e seus respectivos intervalos do confiança (entre parênteses) obtidos para cada proporção entre a associação da paromomicina e outros fármacos para <i>L. braziliensis</i> .....	59
Tabela 5 - Valores das CI de 50% e 90% e seus respectivos intervalos do confiança (entre parênteses) obtidos para cada proporção entre a associação da paromomicina e outros fármacos para <i>L. chagasi</i> .....	60
Tabela 6 - Média do ΣCIFs e avaliação da natureza das interações entre paromomicina (PA) e outros fármacos (anfotericina B – Anf B, Glucantime – Glu, azitromicina – Azi e miltefosina – Milt) em <i>L. braziliensis</i> .....	61
Tabela 7 - Média do ΣCIFs e avaliação da natureza das interações entre paromomicina (PA) e outros fármacos (anfotericina B – Anf B, Glucantime – Glu, azitromicina – Azi e miltefosina – Milt) em <i>L. chagasi</i> .....	62

## Lista de abreviaturas e símbolos

AIDS = síndrome da imunodeficiência adquirida

Anf B = anfotericina B

ATP = trifosfato adenosina

Azi = azitromicina

CC = concentração citotóxica

CFI = concentração fracionária inibitória

CI = concentração inibitória

CI<sub>50</sub>s = concentrações inibitórias de 50%

CO<sub>2</sub> = dióxido de carbono

DNA = ácido desoxirribonucléico

DP = desvio padrão

EUA = Estados Unidos da América

Glu = glucantime

HIV = vírus da imunodeficiência humana

INF- $\delta$  = interferon – gama

IC = intervalo de confiança

IV/IM = intravenoso / intramuscular

Kg = kilogramas

*L.* = *Leishmania*

LV = leishmaniose visceral

MBCL = metilbenzetônio

mg/Kg/dia = miligramas por kilo por dia

Milt = miltefosina

ND = não determinado

NNN = Novy, Mc Neal & Nicolle

NO = óxido nítrico

OMS = Organização Mundial da Saúde

PA = paromomicina

RNA = ácido ribonucléico

RPMI =

SBF = soro bovino fetal

Sb<sup>III</sup> = antimônio trivalente

Sb<sup>V</sup> = antimônio pentavalente

TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral

V. = *Viannia*

WHO = World Health Organization

$\Sigma$ CFI = somatório da concentração fracionária inibitória

$\mu$ l = microlitros

$\mu$ g/mL = microgramas por mililitro

## Resumo

O tratamento das leishmanioses é atualmente realizado com medicamentos que apresentam elevada toxicidade e risco de desenvolvimento de resistência. Além disso, o custo do tratamento para essas enfermidades é considerado elevado para o sistema de saúde pública da maioria dos países onde a leishmaniose é endêmica.

A busca por novos medicamentos para o tratamento das leishmanioses ou por alternativas terapêuticas é considerada prioritária pela Organização Mundial da Saúde, outros organismos nacionais e internacionais e pela comunidade científica.

Entre as alternativas, as formulações genéricas de medicamentos contribuem para reduzir seu custo e para garantia de disponibilidade das drogas, já que são doenças negligenciadas pelo mercado farmacêutico. A associação de medicamentos é uma alternativa que visa principalmente potencializar o efeito de fármacos e reduzir e/ou evitar o surgimento de resistências.

O objetivo deste trabalho foi avaliar alternativas terapêuticas para infecções causadas por *Leishmania* de importância nosológica no Brasil, em três vertentes: 1°) avaliação da atividade leishmanicida do antimoniato de meglumina sintetizado por Farmanguinhos-Fiocruz (lotes TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03 e TAM 021/02), através da comparação com o fármaco referência Glucantime®-Aventis. Foram realizados ensaios *in vitro* em modelos de amastigota-*like* e amastigota intracelular para *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* e ensaio *in vivo* em hamsters infectados com *L. braziliensis*. Os resultados mostraram que os quatro lotes de meglumina-Farmanguinhos apresentam atividade semelhante à do fármaco referência Glucantime®-Aventis, em ambos os modelos *in vitro* e *in vivo*. 2°) avaliação da atividade do fármaco oral miltefosina, recentemente registrada na Índia para o tratamento de leishmaniose causada por *L. donovani*, em modelo *in vitro* de amastigota intracelular sobre as espécies *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. A miltefosina se mostrou igualmente ativa para as espécies de *Leishmania* avaliadas, no entanto, a comparação com a *L. donovani* mostrou que esta espécie é mais sensível. As  $CI_{50}$ s de miltefosina encontradas para as *Leishmania* foram 17 a 19 vezes menores do que a  $CC_{50}$  para macrófago que foi de 37,8  $\mu\text{g/mL}$  e, 3°) identificação de possíveis sinergismos na associação entre a paromomicina (PA) e o Glucantime® (Glu), miltefosina (Milt), anfotericina B (Anf B) e azitromicina (Azi) para *L. chagasi* e *L. braziliensis*. Foi utilizado modelo de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos e a atividade inibitória sobre o

crescimento de amastigotas intracelulares foi determinada pela comparação com controle não submetido à ação de drogas. Foram analisadas sete concentrações para cada um dos cinco fármacos, em ensaios realizados em triplicatas, com três repetições, adotando-se o mínimo de 80% de infecção de macrófagos para validação dos ensaios e considerando-se o número médio de amastigotas contados em 100 macrófagos corados pelo Giemsa, por microscopia de imersão. A associação da PA com os demais fármacos foi determinada através da variação nas concentrações e proporções dos fármacos. Todos os ensaios foram realizados com cepas de referências.

Os ensaios de associação permitiram a composição de uma matriz de tempos de exposição às drogas e concentrações dos fármacos isolados para definição dos parâmetros dos ensaios das associações binárias. Para *L. braziliensis*, o sinergismo foi observado entre PA e ANF, PA e Glu, onde o somatório das concentrações fracionadas inibitórias foi menor do que 0,5 ( $\sum CFI \leq 0,5$ ). Já para *L. chagasi*, sinergismo foi sugerido para as associações PA e Anf B, PA e Azi e PA e Milt.

Os resultados deste estudo abrem perspectivas para o investimento na produção nacional de antimoniato de meglumina, sugere que os estudos clínicos com miltefosina no país devem incluir uma etapa de definição de dose e aponta para o benefício da combinação de fármacos para o tratamento das leishmanioses.



## Abstract

The treatment of leishmaniasis is currently performed with drugs that present high toxicity and risk of development of resistance. Moreover, the treatment for these diseases is considered expensive for the system of public health of the majority of the countries where leishmaniasis is endemic. The search for new drugs for the treatment of leishmaniasis or for therapeutical alternatives is considered a priority by the World Health Organization, other national and international organisms and the scientific community. Among the alternatives, the generic drug formulations contribute to reduce their costs and to guarantee the availability of the drugs, since these are illnesses neglected by the pharmaceutical market. The combination of drugs is an alternative that aims mainly to harness the effect of drugs and to reduce and/or to prevent the sprouting of resistance.

The objective of this work was to evaluate therapeutical alternatives for infections caused by *Leishmania* spp. of medical importance in Brazil, by three approaches: 1°) evaluation of the antileishmanial activity of the meglumine antimoniate synthesized by Farmanguinhos-Fiocruz (batches TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03 and TAM 021/02) by comparing with the reference drug Glucantime®-Aventis. *In vitro* models of amastigote-like and intracellular amastigote were carried out for *L. amazonensis*, *L. chagasi* and *L. braziliensis* and *in vivo* assays were performed in hamsters infected with *L. braziliensis*. The results showed that the four batches of meglumina-Farmanguinhos presented similar activity as compared to the reference drug Glucantime®-Aventis, in both the models *in vitro* and *in vivo*. 2°) evaluation of the activity of the oral drug, miltefosine, recently registered in India for the treatment of leishmaniasis caused by *L. donovani*, using *in vitro* models of intracellular amastigote for the species *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis* and *L. guyanensis*. The miltefosine showed to be equally active for the evaluated species of *Leishmania*, however, the comparison with the *L. donovani* showed that this species is more sensible. The IC<sub>50s</sub> of miltefosine found for the *Leishmania* were 17 to 19 times inferior than the CC<sub>50</sub> for macrophage that was of 37,8 µg/mL. and, 3°) identification of possible synergisms in the association between the paromomycin (PA) and the Glucantime® (Glu), miltefosine (Milt), amphotericin B (Anf B) and azithromycin (Azi) for *L. (L.) chagasi* and *L. (V.) braziliensis*. The mice peritoneal macrophages model was used and the inhibitory activity on the intracellular growth of amastigotes was determined by the comparison with the control not submitted to the

action of drugs. They were analyzed in seven concentrations for each one of the five drugs, in assays carried through in triplicates with three repetitions, adopting the minimum of 80% of infection of the control macrophages for validation of the assays and considering the mean number of amastigotes in 100 macrophages stained by Giemsa. The association of the PA with the other drugs was determined through the variation in the concentrations and proportion of the drugs. All the assays were carried out with references strains.

The association assays allowed to the composition of a matrix of times of exposition to drugs and concentrations of the isolated drugs for the definition of the parameters of the assays of the binary associations. For *L. braziliensis*, the synergism was observed between PA and Anf B and PA and Glu, where the sum of the fractional inhibitory concentrations was lower than 0.5 ( $\sum CFI \leq 0,5$ ). Differently, for *L. chagasi*, synergism was suggested for the associations PA and Anf B, PA and Azi and PA and Milt.

The results of this study open perspectives for the investment in the national production of meglumine antimoniate, suggest that the clinical studies with miltefosine in the country must include a stage of dose definition and point to the benefit of the drug combination for the treatment of leishmaniasis.

## 1 Introdução

As leishmanioses são causadas por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, que apresenta uma forma flagelada (promastigota), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada (amastigota), nos tecidos dos vertebrados. Dependendo da espécie infectante e de determinantes de susceptibilidade dos hospedeiros, as infecções se apresentam sob diferentes aspectos clínicos: na forma tegumentar (cutânea, mucosa e mucocutânea) ou visceral.

Pelo seu considerável impacto sobre a saúde mundial, as leishmanioses estão entre as dez endemias prioritárias pela Organização Mundial da Saúde - OMS. Estima-se que a prevalência da infecção no mundo seja de 12 milhões de pessoas e que cerca de 350 milhões estejam sob risco de adquirir a doença. A distribuição dessas infecções abrange a África, as Américas, a Ásia e o sul da Europa. A estimativa da incidência mundial de leishmaniose visceral é de 500.000 casos, sendo que 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. A incidência mundial de leishmaniose tegumentar é de 1,5 a 2,0 milhões, sendo que 90% dos casos de leishmaniose mucosa ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru e 80% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Desjeux, 2004, [http: www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr) 2007).

No Brasil, observa-se o aumento do número de casos de leishmanioses nos últimos anos, acompanhado também pela expansão geográfica. As principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose tegumentar no país são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a mais frequentemente encontrada e também mais frequentemente associada à forma clínica mucosa, *L. (Leishmania) amazonensis*, dispersa pelas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país, também responsável pela manifestação difusa anérgica da leishmaniose cutânea e *L. (V.) guyanensis*, de ocorrência nas regiões norte e nordeste do país (Brasil 2006a). *L. (L.) chagasi* é a espécie responsável pela leishmaniose visceral, que quando não tratada pode evoluir para a forma grave da doença, debilitando e incapacitando pacientes, até a morte.

A infecção causada pelos parasitos dermatrópicos promove ulcerações na pele, principalmente em partes expostas do corpo como face, braços e pernas, que variam em extensão e gravidade. Além disso, a forma cutânea da doença causada

pela espécie *L. braziliensis* pode progredir para o acometimento das mucosas dos sistemas respiratório e digestivo, levando à leishmaniose mucosa, forma clínica de difícil diagnóstico e tratamento, que apresenta recidivas freqüentes e deixa seqüelas funcionais e estéticas.

As leishmanioses são doenças para as quais não se dispõe de instrumentos adequados de controle. Na última década, a incidência da infecção vem aumentando não só no Brasil, mas em todo o mundo e são considerados ineficientes os instrumentos de intervenção em seus diferentes aspectos: diagnóstico, terapêutico e controle de vetores e reservatório.

No que se refere ao tratamento dessas infecções, os principais obstáculos incluem custo elevado, considerando-se o sistema de saúde pública de países em desenvolvimento, a co-infecção *Leishmania*/HIV, com maior freqüência de falhas terapêuticas, a resistência em larga escala ao antimonial pentavalente, principalmente na Índia (Murray 2001) e também a resistência clínica aos outros fármacos atualmente empregados no tratamento das leishmanioses (Croft, Sundar & Fairlamb 2006).

O desenvolvimento de resistência aos fármacos leishmanicidas demonstra a necessidade urgente de pesquisa por novos fármacos e/ou a busca de alternativas de tratamento para as leishmanioses.

Todos os fármacos leishmanicidas mais frequentemente empregados na terapêutica das leishmanioses e listados a seguir, apresentam limitações na forma de administração, toxicidade, resistência ou custo.

### **1.1 Antimoniais pentavalentes**

Os compostos orgânicos de antimônio pentavalente ( $Sb^V$ ) permanecem como a primeira linha de escolha para o tratamento das leishmanioses visceral e cutânea, em muitos países. Esse composto, na sua forma trivalente ( $Sb^{III}$ ) foi primeiramente testado em pacientes com leishmaniose tegumentar, em 1912 pelo médico Gaspar Vianna e era denominado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio). Nesta época, 90% dos casos de leishmaniose evoluíam para óbito e o que se observou foi algum sucesso no tratamento com o tártaro emético (Laison 1996). Em 1915, a eficácia do tártaro emético foi confirmada no tratamento do calazar infantil na Itália e o composto foi amplamente usado durante a epidemia de calazar em Assam, leste da Índia (Marsden 1985). No entanto, esta formulação apresentava toxicidade

elevada, ocasionando tosse, dores no peito e depressão, além de ser de difícil administração. Em 1920, Bramachari desenvolveu o primeiro antimônio pentavalente ( $Sb^V$ ) e uma substância mais estável do que o composto trivalente, o estibogluconato de sódio (Pentostan®), foi formulado na Alemanha por Schmidt, em 1936. Este novo composto apresentava estabilidade em água, poderia ser estocado em solução até o momento do uso e era administrado por via intramuscular, endovenosa ou subcutânea. Além disso, houve redução de alguns efeitos colaterais e da toxicidade em relação ao tártaro emético. Uma alternativa ao Pentostan® surgiu no final da segunda guerra mundial com o desenvolvimento do também antimônio pentavalente, o N-methyl-glucamina, comercializado como Glucantime®, sendo a eficácia confirmada desse novo composto para as leishmanioses cutânea e visceral (Marsden 1985).

Por razões de mercado, o estibogluconato de sódio - Pentostan® - foi usado para o tratamento das leishmanioses principalmente em países de língua ou colonização inglesa e em países de língua ou colonização francesa ou espanhola (Berman 1988). No Brasil, o fármaco empregado é o antimônio pentavalente, antimônio de meglumina - Glucantime®.

A estrutura desses compostos não é totalmente conhecida, mas foi sugerido por Roberts et al (1998) que a composição do antimônio de meglumina é análoga ao do estibogluconato de sódio, ou seja, uma complexa mistura de polímeros de carbono ligada a um único átomo de antimônio.

Por ser de administração endovenosa ou intramuscular, o antimônio de meglumina é rapidamente absorvido e praticamente 90% de antimônio é excretado nas primeiras 48h pelos rins. Em consequência, é necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir quantidade adequada de antimônio nos tecidos e assim, permitir a eficácia do tratamento.

Existe outro pico de eliminação, lento que é de 72 horas e que é principalmente responsável pela conversão de  $Sb^V$  a  $Sb^{III}$  nos tecidos e provavelmente relacionado à toxicidade cumulativa.

Os antimônios vêm sendo empregados no tratamento das leishmanioses por mais de 70 anos, mas apesar disso, pouco se compreende sobre o mecanismo de ação desse fármaco. Sugere-se que o antimônio pentavalente ( $Sb^V$ ) seja uma pró-droga, convertido em antimônio trivalente ( $Sb^{III}$ ) após sua administração (Roberts, MacMurray & Raubey 1998). Em 1997, Sereno et al demonstraram que o  $Sb^{III}$  foi substancialmente mais potente que o  $Sb^V$  para ambas, formas promastigotas e

amastigotas axênicas de *L. mexicana*, *L. amazoensis* e *L. infantum*. Já Shaked-Mishan et al (2001) mostraram que a redução do  $Sb^V$  a  $Sb^{III}$  ocorreu em amastigotas mas não em promastigotas de *L. donovani*. Quanto ao local onde a redução da forma pentavalente para trivalente ocorre, são sugeridos o interior dos macrófagos hospedeiros ou no próprio parasito (Roberts & Rainey 1993; Sereno et al 1998). Ouellette et al (2004) propõem um modelo de resistência aos antimoniais em que há possibilidade da redução do antimônio ocorrer nas células do hospedeiro ou no interior do parasito. Outro estudo, que também colabora para a hipótese da conversão metabólica do  $Sb^V$  é o de Miekeley et al (2002). Após administração intramuscular do antimoniato N-metilglucamina em pacientes com leishmaniose, ocorreu conversão do composto orgânico para as formas iônicas  $Sb^{III}$  e  $Sb^V$ .

Os antimoniais pentavalentes (ou a forma ativa trivalente) parecem interferir na produção de energia em amastigotas de *Leishmania*, inibindo tanto a glicólise com a  $\beta$  oxidação dos ácidos graxos, levando a depleção de ATP intracelular (Tracy & Webster Junior 2003).

Outra possibilidade de mecanismo de ação dos antimoniais pentavaletes é que na forma amastigota de *Leishmania* existe uma metaloproteinase zinco dependente, que poderia ser inativada se o antimônio substituísse o zinco nesta enzima, que é essencial para o desenvolvimento do parasito (Bangs et al 2001). Foi demonstrado ainda por Chakraborty & Majunder (1988) que o agente ativo do Pentostan® é capaz de inibir a enzima topoisomerase II, purificada de *L. donovani*. O tratamento de promastigotas de *L. panamensis* com antimoniais pentavalentes foi capaz de estabilizar complexos de DNA-proteína, estando assim de acordo com a inibição da topoisomerase (Lucumi et al 1998). Os antimoniais pentavalentes também foram capazes de inibir a enzima fosfofrutoquinase envolvida na síntese de nucleotídeos trifosfatados (Berman et al 1985).

Pacientes imunodeprimidos com leishmaniose respondem pobremente aos antimoniais, apresentando falha e recidivas da ordem de 52% entre 1 e 36 meses após o tratamento (Desjeux 1999), sugerindo assim que a ação dos antimoniais requer a atuação conjunta do sistema imunológico.

Dependendo da dose e do tempo de administração, os antimoniais pentavalentes podem ser bem tolerados, mas em geral surgem reações colaterais que vão desde incômodos como dor no local da injeção, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas e enrijecimento das articulações até reações adversas graves, como arritmias cardíacas e pancreatite. Além disso, observa-se ainda

elevação das transaminases hepáticas e amilase que, no entanto, são reversíveis após o final do tratamento (Gasser et al 1997; Tracy & Webster Junior 2003).

Novas apresentações terapêuticas para os antimoniais foram desenvolvidas nas últimas décadas. As formulações encapsuladas em lipossomo apresentaram atividade leishmanicida contra a infecção pela *L. chagasi* em hamsters. Nessa formulação, o fármaco é captado seletivamente por endocitose e alcança os fagolisossomos do macrófago, onde se encontram os parasitos (Frézard et al 2000). A vantagem do encapsulamento dos antimoniais em lipossomos consiste em possibilitar a redução dos efeitos colaterais, direcionando o fármaco para o sítio de ação, além de controlar a concentração e a velocidade de liberação do composto no órgão alvo. Resposta de linfócitos T do tipo 1 mais exacerbada foi observada em camundongos tratados com estibogluconato de sódio encapsulado, quando comparada com a administração da substância livre (Banduwardene et al 1997).

Estudos com formulação genérica do estibogluconato de sódio (Albert Davis Ltda., Calcutá – Índia) foram conduzidos no Sudão, Kênia, Etiópia, Bolívia e Colômbia para o tratamento de pacientes com leishmaniose visceral ou tegumentar. A eficácia e a segurança do genérico foram semelhantes às do Pentostan® e do Glucantime®. Além disso, o custo do medicamento genérico é de aproximadamente 7% do valor do Pentostan® e 20% do Glucantime® (Veeken et al 2000, Moore et al 2001, Ritmeijer et al 2001, Soto et al 2004, Bermúdez et al 2006).

Recentemente lotes de antimoniato de meglumina foram sistetizados por Farmanguinhos, a indústria farmacêutica da Fundação Oswaldo Cruz e sua atividade *in vitro* e *in vivo* foi comparável à do fármaco referência Glucantime®-Aventis (Morais-Teixeira et al 2008)

O modo de administração parenteral, a longa duração dos esquemas terapêuticos (20 a 30 dias) e as reações adversas freqüentes e potencialmente graves, constituem desvantagens importantes para o uso dos antimoniais. Além destes problemas, há a ocorrência de fracasso terapêutico em alguns países, como Índia e Quênia. Em Bihar na Índia, 50-60% dos pacientes não respondem ao tratamento com o  $Sb^V$  (Croft 2001).

No Brasil, o tratamento de primeira escolha para leishmaniosae visceral recomendado pelo Ministério da Saúde é o antimonial pentavalente: antimoniato N-metil glucamina (20mg de  $Sb^V$  Kg/dia IV/IM, por 20-40 dias) (Brasil 2006b).

Assim, o fármaco atualmente considerado como de primeira escolha em quase todo o mundo está longe de ser satisfatório.



## 1.2 Anfotericina B

A anfotericina B pertence ao grupo dos antibióticos poliênicos produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces*. Foi obtida a partir do *Streptomyces nodosus*, isolado da bacia do rio Orinoco na Venezuela em 1956 (Donovlick et al 1955-1956). A anfotericina é encontrada sob duas formas: A e B, sendo a última mais ativa e a única usada clinicamente (Vandeputte et al 1956).

A anfotericina B é um fármaco anfotérico, insolúvel em água e com pH neutro. A formulação licenciada para o uso de rotina clínica, produzido e comercializado pela Bristol-Myers Squibb como Fungizon® é a mistura de anfotericina B com o detergente desoxicolato em tampão fosfato, o que promoveu a solubilização da substância (Brajtburg & Bolard 1996).

Após a infusão venosa de uma dose terapêutica de desoxicolato de anfotericina B (0,65 mg/Kg), níveis séricos máximos de 1,8 a 3,5 µg são atingidos na primeira hora de infusão (Louria 1958, Bennett 1987). Esses níveis permanecem por seis a oito horas e então caem gradativamente. A anfotericina B não sofre acumulação plasmática com a utilização de doses diárias. Ao final de uma infusão de quatro horas, o fármaco é eliminado do sangue, com meia-vida inicial de 24 a 48h (Atkison & Bennett 1978).

A atividade leishmanicida desse antibiótico foi demonstrada no final da década de 50, quando passou a ser utilizado no tratamento da doença, sendo considerado uma alternativa para o tratamento das leishmanioses mucocutânea e visceral. O mecanismo de ação deste fármaco decorre de sua ligação ao ergosterol, com conseqüente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (Saha et al 1986, Oliaro & Bryceson 1993, Urbina 1997, Tiphine et al 1999). *Leishmania* e fungos contêm ergosterol como principal constituinte de suas membranas plasmáticas, ao invés do colesterol das membranas de células animais e esse fato, provavelmente explica a eficácia da anfotericina B contra *Leishmania* spp. Em Bihar na Índia, onde 60% dos pacientes com leishmaniose visceral não respondem mais ao tratamento com os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B está sendo recomendada como primeira linha de tratamento (Chappuis et al 2007). Assim, o uso clínico da anfotericina B é recomendado para gestantes, para casos graves de leishmaniose, casos de falha terapêutica ou presença de efeitos adversos intensos com o uso de antimoniais e em situações de risco de morte. Apesar do custo elevado, devido à possibilidade de



tempo mais curto de administração, eficácia e menor frequência de efeitos adversos, a anfotericina B lipossomal é considerada o melhor fármaco atualmente disponível para o tratamento da leishmaniose visceral e em muitos países da Europa e Estados Unidos é utilizada como a primeira linha de tratamento para essa doença.

No Brasil, como terapia de segunda escolha, o Ministério da Saúde indica o desoxicolato de anfotericina B, que é empregado em situações de toxicidade ou refratariedade ao tratamento com antimonial, contra-indicação formal ao tratamento com antimonial pentavalente, incluindo gestação e em casos de leishmaniose visceral grave (Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Ministério da Saúde 2006b). A dose recomendada é de 1mg/kg/dia, em dias alternados, com dose total de 3g para adultos e 15 a 25 mg/kg de peso para crianças. Os efeitos colaterais apresentados com o uso da anfotericina B ocorrem principalmente durante a infusão venosa, sendo febre, náusea, vômito, calafrios, hipotensão ou hipertensão, comprometimento da função renal e redução dos níveis séricos de potássio (Brajtburg & Bolard 1996). O tratamento requer hospitalização para permitir controles laboratoriais e ser administrada em forma diluída em infusão de 4 a 6h. O tempo total de tratamento é de 14-20 dias.

Um estudo feito em Montes Claros, Minas Gerais, comparou a eficácia de monoterapia com desoxicolato de anfotericina B em doses de 0,5mg/Kg/dia ou 1mg/Kg/dia, durante 14 dias. As taxas de cura foram de 57% (12/21) e 97,5% (78/80) respectivamente, sugerindo que a dose de 14mg/Kg, mais baixa do que a recomendada pelo Ministério da Saúde, apresenta bom índice de cura para esta população (Carvalho, 2000).

No final da década de 1990, novas formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas, visando diminuir sua toxicidade. Nestas formulações, o desoxicolato foi substituído por outros lipídios: anfotericina B lipossomal - Ambisome® (Fujisawa, Deerfield, IL/EUA), colesterol sulfato de anfotericina B - Amphotec® (Sequs, MentoPark, CA/EUA) e complexo lipídico de anfotericina B - Albecet (Liposome Co, Princeton, NJ/EUA). Essas formulações são bem absorvidas pelo sistema fagocítico mononuclear, no qual as leishmanias se encontram, sendo pouco absorvidas pelo rim, o órgão alvo de toxicidade do fármaco. Mullen, Carter & Baillie (1997) compararam a eficácia das novas formulações lipídicas de anfotericina B em camundongos e verificaram que todas as formulações levaram à redução significativa da carga de parasitos no baço e na medula óssea dos animais

infectados com *L. donovani*, quando comparados com os órgãos dos animais-não tratados.

Yardley & Croft (2000) compararam, em estudo *in vivo*, a atividade do Fungizon® e outras três formulações lipídicas de anfotericina B. Para *L. donovani*, Ambisome® e Amphocil® foram mais ativos que o Albecet® e para *L. major*, Ambisome® na dose de 25 mg/Kg promoveu maior redução do tamanho das lesões do que o Amphocil® ou o Albecet®. Nos ensaios *in vitro* em macrófagos murinos infectados com *L. donovani*, a atividade leishmanicida foi maior com o Amphocil®, seguida pelo Albecet® e pelo Ambisome®; e para *L. major*, a seqüência foi Fungizon®, Amphocil®, Ambisone® e Albecet®. No entanto, o resultado foi diferente em estudo *in vitro*, quando a infecção com *L. donovani* foi realizada em macrófagos THP-1 (Amphocil® = Albecet® > Ambisone > Fungizon®). A eficácia da anfotericina B lipossomal foi maior do que a obtida com o fármaco livre em camundongos Balb/c infectados com *L. major* (Yardley & Croft 1997).

Apesar da elevada eficácia e relativa menor toxicidade das novas formulações lipídicas de anfotericina B no tratamento das leishmanioses, o alto custo (US\$ 2.800) inviabilizava seu uso no sistema de saúde pública de países em desenvolvimento. Felizmente, em maio de 2007 a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou uma drástica redução no preço da droga (US\$ 200) para que ela possa ser utilizada nos serviços de saúde pública de países onde a leishmaniose visceral é endêmica (Chappuis et al. 2007).

### 1.3 Miltefosina

Medicamentos eficazes com via de administração oral são altamente desejáveis no tratamento das leishmanioses. Em 1987, Croft et al pela primeira vez, mostraram a atividade leishmanicida da miltefosina sobre *L. donovani*. A partir de então, outros estudos foram confirmando a atividade do fármaco sobre as diferentes espécies de *Leishmania*. Sundar et al (1998) avaliaram que a miltefosina usada na dose de 100 a 150 mg/dia por quatro semanas foi eficaz e tolerável em pacientes tratados de leishmaniose visceral. O fármaco vem sendo usado na Índia para o tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com antimoniais (Sindermann et al 2003).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer. Administrada oralmente, o fármaco tem

um longo período de meia-vida, variando de 100 a 200 horas. Os níveis do fármaco no plasma permanecem constantes após 26 dias de administração contínua (Berman et al. 2006).

O modo de ação da miltefosina sobre *Leishmania* ainda é controverso. Em células tumorais, o fármaco age induzindo apoptose e alterando as vias de sinalização celular mediada por lipídios (Arthur, Bittiman 1998). A apoptose celular em promastigotas de *L. donovani* está demonstrada no estudo de Verna e Dey (2004).

Outros estudos sugerem que a miltefosina apresenta propriedades imunomoduladoras (Vehmeier et al 1991, Hochhuth et al 1992, Eue et al 1995). Entretanto, Murray e Deph-Etienne (2000) mostraram que a miltefosina permanece com suas propriedades anti-tumorais em camundongos imunodeficientes, sugerindo que sua atividade não depende da resposta imune mediada por células T.

A atividade da miltefosina também foi investigada em camundongos *scid*, ou seja, deficientes funcionalmente na produção de células T e B e comparada com o ambisome e estibogluconato de sódio (Escobar, Yardley & Croft 2001). Neste estudo, ficou demonstrado que a ação da miltefosina em *L. donovani* é independente da resposta imune mediada por células T e B. O ambisome apresentou níveis de atividade semelhantes ao da miltefosina para camundongos *scid* e Balb/c infectados com *L. donovani*, o que sugere também, uma atividade independente da resposta imune mediada por células T e B. Já o estibogluconato de sódio foi menos ativo nos animais deficientes de células T e B, sugerindo assim, que sua atividade é dependente dessas células. Essa dependência foi observada no estudo de pacientes imunodeprimidos tratados com antimonial pentavalente (Desjeux 1999).

Na Índia, a miltefosina foi registrada para o tratamento da leishmaniose visceral em março de 2002. A eficácia deste fármaco também foi confirmada para uma espécie cutânea do Velho Mundo. Mohebbi et al (2007) consideraram que o tratamento da miltefosina foi tão bom quanto o tratamento com o antimoniato de meglumina em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. major*. O fármaco foi também usado com sucesso no tratamento de pacientes portadores de HIV, infectados com *L. major* (Schraner et al 2005).

Na Colômbia e na Guatemala, em estudo com controle de placebo, a miltefosina (2,5 mg/Kg/dia, durante 28 dias), foi utilizada no tratamento da leishmaniose cutânea. Na Colômbia, onde a *L. panamensis* é mais prevalente, foram obtidas taxas de cura de 91%, comparadas com 38% no grupo placebo. Já na Guatemala, onde

predominam *L. braziliensis* e *L. mexicana*, foi obtida baixa taxa de cura de 53% no grupo tratado, comparada à de 21% no grupo placebo (Soto et al 2004). No entanto, o mesmo grupo de autores em 2006 obteve taxas de cura de 85%, 88% e 82% após 2,4 e 6 meses respectivamente de tratamento com miltefosina em pacientes bolivianos com leishmaniose cutânea por *L. braziliensis*. O fármaco foi considerado eficaz no tratamento da doença (Soto & Toledo 2006).

No Brasil, a eficácia da miltefosina foi semelhante, senão maior que a do N- metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea experimental causada por *L. amazonensis* em camundongos (Costa Filho et al 2008).

Um ensaio clínico com a miltefosina para o tratamento da leishmaniose visceral está em andamento em Montes Claros e Teresina, mas os resultados iniciais mostraram baixa taxa de cura com as mesmas doses usadas na Índia, o que levou os pesquisadores a prolongarem o tempo de tratamento (comunicação pessoal: Dr. Reinaldo Dietze).

A miltefosina, além de ser eficaz no tratamento das leishmanioses, é o único fármaco leishmanicida eficaz de via de administração oral. Os problemas relacionados ao uso deste fármaco no tratamento das leishmanioses incluem efeitos adversos que afetam o sistema gastrointestinal, causando principalmente vômitos e diarreia (Kaminsky 2002), aumento nos níveis sanguíneos de transaminase, bem como uréia e creatinina (Fischer et al 2001) e também a resistência induzida *in vitro* do fármaco em linhagens de promastigotas de *L. donovani* (Seifert et al 2003). Foi demonstrado ainda pelo mesmo grupo, que a resistência experimental induzida em promastigotas de *L. donovani* foi mantida em amastigotas, caracterizando assim, um fenótipo de relevância clínica para este estágio do parasito (Seifert et al 2006). No entanto, a maior limitação do uso da miltefosina consiste no seu emprego em mulheres em idade fértil uma vez que este fármaco apresentou efeitos teratogênicos em animais (Kaminsky 2002). A possibilidade do uso da miltefosina em mulheres em idade fértil associada à prescrição de contraceptivos orais, como tem sido sugerido por alguns autores, geraria mais custos para o sistema de saúde pública de países em desenvolvimento e dessa forma poderia inviabilizar seu uso.

#### **1.4 Paromomicina**

A paromomicina (ou aminosidina) é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, licenciada na Europa para o tratamento parenteral de

infecções bacterianas. Esta substância apresenta um espectro de atividade parasitária que não é apresentado por outro antibiótico aminoglicosídeo. A utilização da paromomicina oral foi recomendada para o tratamento de teníase e amebíase. A atividade deste fármaco contra leishmaniose cutânea experimental foi demonstrada pela primeira vez em 1963 (apud Neal et al. 1995).

Em bactéria, os aminoglicosídeos inibem a síntese de proteína através da ligação à subunidade ribossomal 30S, causando a terminação prematura da tradução do RNA mensageiro. A ação da aminosidina foi demonstrada em promastigotas de *L. donovani*, apresentando modificações na síntese de RNA e em lipídios polares de membrana, promovendo alterações na fluidez da mesma (Maarouf et al 1997a). Outras implicações observadas foram alterações no ribossomo mitocondrial e disfunção na indução respiratória (Maarouf et al 1997b).

A formulação tópica da paromomicina a 15% associada a cloreto de metilbenzetônio (MBCL) a 12% foi eficaz em pacientes de Israel infectados por *L. major* e pacientes da Guatemala portadores de leishmaniose cutânea (El-On et al 1986; Arana et al 2001). No entanto, efeitos adversos foram relatados para essa formulação.

Em camundongos, a formulação paromomicina-MBCL foi pouco ativa e tóxica para infecções com *L. panamensis* e *L. amazonensis* (El-On & Hmburger 1987, Neal et al. 1994).

Devido à toxicidade local das formulações de paromomicina e MBCL, seu uso clínico ficou limitado. Foi testada então, uma nova formulação tópica, contendo 15% de paromomicina e 10% de uréia que visava facilitar a penetração da paromomicina na lesão de pele (Bryceson et al 1994). Em estudo comparativo, em portadores de leishmaniose devido a *L. major*, a atividade de uma pomada de paromomicina a 15% e uréia foi de 68% e a observada com administrações intralesionais de antimoniato de meglumina foi de 66%, sem diferença significativa entre os dois grupos (Shazad et al 2005).

A partir de estudos que demonstraram maior permeação cutânea de paromomicina através de formulações hidrofílicas (géis ou cremes), um grupo de pesquisadores da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais desenvolveu uma formulação gel deste fármaco (Ferreira et al 2002). A eficácia dessa formulação tópica foi avaliada em colaboração com o Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou em modelos animais infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Gonçalves et al 2005). Neste

estudo, o tratamento com a paromomicina gel promoveu redução significativa do tamanho das lesões, apresentando atividade maior ou equivalente ao tratamento com o antimonial pentavalente - Glucantime®. Esta nova formulação livre do metilbenzetônio (agente implicado na toxicidade local) constitui vantagem em relação às formulações anteriores.

Na década de 90, estudos mostraram que a paromomicina por via parenteral também foi ativa no tratamento da leishmaniose visceral em áreas endêmicas (Chunge et al 1991, Scott et al 1992, Thakur et al 1992). O fármaco é registrado na Índia para o tratamento de leishmaniose visceral desde 2006. Na Índia, o tratamento de leishmaniose visceral com paramomicina intramuscular por 21 dias mostrou eficácia de 94,6%, comparável à da anfotericina B. (Sundar et al., 2007). Apesar de ser uma medicação administrada por via intramuscular, a paramomicina é ainda considerada uma boa alternativa terapêutica devido à alta eficácia menor tempo de tratamento que os demais medicamentos disponíveis (21 dias) e por seu baixo custo.

Neal et al (1995) determinaram a sensibilidade *in vitro* à aminosidina de várias cepas de *Leishmania* spp. causadoras de leishmaniose cutânea e visceral, encontrando variações de sensibilidade dessas diferentes cepas para este fármaco.

Mais recentemente, um estudo realizado com pacientes com leishmaniose visceral na Índia mostrou que a atividade da paromomicina é equivalente à da anfotericina B no tratamento desta doença (Sundar et al 2007).

No Brasil, Romero et al (1998) trataram pacientes portadores de leishmaniose mucosa com sulfato de aminosidina (16 mg/Kg/dia, via intramuscular/ 20 dias). Foi obtido 66,5% de remissão completa da lesão nos pacientes até três meses após o tratamento. Mais recentemente, um estudo avaliando o tratamento de uma formulação hidrofílica da paromomicina tópica em pacientes com leishmaniose cutânea mostrou que apesar da cura das lesões requerer mais de 20 dias de tratamento para cicatrização completa, os efeitos adversos não promoveram interrupção do tratamento e efeito terapêutico foi obtido com essa nova formulação (Santos et al 2008).

Como relatado acima, a paromomicina vem apresentando atividade leishmanicida tanto para o tratamento da leishmaniose cutânea como visceral. Apesar de ser bem tolerada, é potencialmente nefrotóxica e ototóxica, podendo causar surdez irreversível, além de ser contra indicada durante a gravidez. Outro



problema relacionado a este fármaco é a resistência induzida *in vitro* para promastigotas de *L. donovani* (Maarouf et al 1998).

O uso de formulações tópicas da paromomicina associada a outros fármacos com atividade leishmanicida pode contribuir para aumentar sua eficácia e reduzir os efeitos colaterais do fármaco.

### **1.5 Azitromicina**

A azitromicina é um antibiótico azalídeo da família dos macrolídeos. Os macrolídeos interferem com a síntese de proteínas pela ligação à subunidade ribossomal 50S de organismos susceptíveis (Scheinfeld et al 2004). Em geral são bacteriostáticos.

As vantagens atribuídas à azitromicina consistem em: concentrar-se nos tecidos, especialmente em macrófagos, com níveis 100 a 200 vezes maiores que as concentrações encontradas no soro; apresentar possibilidade de via de administração oral ou injetável; ser considerada relativamente segura para o uso em crianças e mulheres grávidas e apresentar baixo perfil de toxicidade (Krolewiecki et al 2002). Os principais efeitos adversos da azitromicina afetam o trato gastrointestinal, causando náuseas, vômito e diarreia, podendo ocorrer também, elevação das enzimas hepáticas, nefrites intersticiais, cefaléias, ototoxicidade e raramente, tonteados.

O metabolismo deste fármaco é primariamente hepático e seus metabólitos possuem pouca ou nenhuma bioatividade (Epstein et al 1997). A concentração plasmática máxima após uma dosagem plena de 500 mg é de 0,4 µg/mL, que se segue à administração de 250 mg diários por quatro dias, com concentração máxima de 0,24 µg/mL (Lalak & Morris 1993). O pico inicial plasmático ocorre em 11 a 14 horas e é seguido por uma prolongada meia-vida de aproximadamente 68 horas, sendo a droga lentamente removida dos tecidos.

A azitromicina tem alcançado taxas variáveis de sucesso no tratamento de diferentes infecções causadas por protozoários que afetam os humanos, como *Acanthamoeba* (Schuster & Vivesvara 1998), *Cryptosporidium parvum* (Hicks et al 1996), *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* (Taylor et al 1999, Puri & Singh 2000) e *Toxoplasma gondii* (Blais et al 1994, Dumas et al 1994, Beckers et al 1995).

Em 2002, Krolewiecki et al demonstraram a atividade da azitromicina em modelos *in vitro* e *in vivo* sobre promastigotas e amastigotas de *L. major*. Foi obtida redução significativa na contagem de parasitos em cultura, tratados com o fármaco. Em ensaios de amastigota intracelular, a azitromicina levou à diminuição significativa na contagem de parasitos. Camundongos infectados com *L. major* e tratados com 100 a 200 mg/Kg/dia de azitromicina apresentaram diminuição significativa de tamanho de lesão e de número de parasitos por lesão.

Tanyuksel et al (2003) também investigaram a ação *in vitro* da azitromicina em *L. major* e observaram que a ação do fármaco em baixa dose (0,05 µg/mL) não diferiu da ação do controle sem droga; mas em doses mais elevadas (0,1, 0,3 e 0,6 µg/mL) os autores observaram atividade significativa da azitromicina.

A atividade em modelo *in vivo*, da azitromicina foi avaliada recentemente para espécies de *Leishmania* do Novo Mundo: *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. A azitromicina foi ativa contra *L. braziliensis*, mas não contra *L. amazonensis* em modelo hamster dourado. Essa atividade foi inferior à do antimoníato de meglumina para o controle da lesão e ambos os fármacos (azitromicina e antimoníato de meglumina) não promoveram a esterilização dos parasitos da lesão (Sinagra et al 2007).

O estudo de Oliveira-Silva, Morais-Teixeira e Rabello (2008) mostrou que a azitromicina foi ativa em modelo *in vitro* de promastigota e amastigota intracelular para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*.

Prata et al (2003) em estudo aberto não controlado, relataram ter tratado 24 pacientes portadores de leishmaniose cutânea, com 500 a 1000 mg diários de azitromicina, por períodos de dois a dez dias tendo obtido 85% de cura clínica. Segundo os autores, apesar de não ter sido incluído grupo controle, uma mudança clara nas características das lesões foi observada, sugerindo efeito evidente da azitromicina e não a resolução espontânea, eventualmente observada na forma cutânea da doença. Silva-Vergara et al (2004), em estudo realizado em Minas Gerais, trataram três pacientes idosos com leishmaniose mucosa de longa evolução e portadores de cardiopatia com azitromicina via oral, em dose única diária de 500mg, durante dez dias, em três séries com intervalos de um mês. Em todos os pacientes houve cicatrização das lesões depois da terceira série.

Um estudo piloto com azitromicina oral foi realizado no Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou. Nesta avaliação, 11 de



13 (84,6%) dos pacientes tratados foram curados com doses que variaram de seis a 20 comprimidos em administrações orais de 500 mg diários (dados não publicados).

## 1.6 Outros fármacos com atividade leishmanicida

### 1.6.1 Pentamidinas

As pentamidinas são compostos orgânicos caracterizados pela presença dos grupamentos C=N e C-N, que proporcionam propriedades específicas das funções azometina e amina, respectivamente. Esses compostos apresentam atividade biológica variada e os derivados aromáticos como a pentamidina e o Berenil® (agentes terapêuticos contra tripanossomíase africana) são os compostos mais representativos. A pentamidina, uma diamina aromática, apresenta atividade tripanosomicida, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (Berman 1998). Para o tratamento das leishmanioses, esse composto tem sido usado desde 1939.

As diaminas aromáticas ligam-se seletivamente ao DNA do cinetoplasto do *Trypanosoma cruzi* e *T. rhodensense*, produzindo alterações estruturais no cinetoplasto, levando à sua completa destruição (Robert & Briggaman 1977).

Em *Leishmania donovani*, a pentamidina parece inibir o transporte de arginina (Kandpal et al 1995, Kandpal et al 1996) e inibe também enzimas, como a ornitina descarboxilase e a espermicina sintetase, impedindo assim, a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasito (Bacharach et al 1979, Basselin et al 1997). Esses compostos são capazes ainda de se ligar ao DNA em regiões ricas em seqüências A-T (adenina – timina).

O isotionato de pentamidina é razoavelmente bem absorvido por administração parenteral. Aproximadamente 15 a 20% do composto é excretado na urina. A maior parte é depositada no fígado e rim e uma pequena proporção na pele.

A alta proporção de cura de leishmaniose cutânea está associada a baixas doses de pentamidina administrada por curtos períodos. Em um estudo na Colômbia, onde os pacientes podem estar infectados por *L. panamensis*, *L. braziliensis* ou *L. mexicana*, o tratamento curto e com baixas doses de pentamidina proporcionou cura de 96%, semelhante ao do antimoniato de meglumina (91%). A frequência de efeitos adversos também foi similar entre eles (Soto et al 1994).

Para a leishmaniose visceral, a pentamidina tem sido usada com o fármaco de segunda escolha em casos refratários ao tratamento com os antimoniais pentavalentes. No entanto, diferente do tratamento da leishmaniose cutânea, para o tratamento desta doença são necessários longos esquemas terapêuticos para prevenir recidivas, elevando a toxicidade da pentamidina (Bryceson 1985), podendo contribuir para o surgimento de resistência.

Resistência induzida *in vitro* em promastigotas de *L. mexicana* foi obtida para a pentamidina (Basselin et al 2002).

Os efeitos adversos causados pelo uso da pentamidina incluem: dispnéia, taquicardia e tonturas ou sensação de desmaio, cefaléia e vômitos. Além desses sintomas, manifestam também erupções cutâneas, tromboflebite, trombocitopenia, anemia, neutropenia, elevação de enzimas hepáticas e nefrotoxicidade (Vohringer & Arastéh 1993). O efeito adverso mais grave da droga é a indução de diabetes não reversível.

Devido aos indícios de resistência, redução de eficácia e toxicidade, a pentamidina está sendo abandonada para o tratamento das leishmanioses na Índia e em vários países, inclusive o Brasil (Sundar 2001; Manual de Leishmaniose visceral, Brasil, 2003).

### **1.6.2 Alopurinol**

O alopurinol é um inibidor de síntese de purinas que inibe a captação de purinas de células de mamíferos, através do bloqueio de enzima HGPT do parasito (Soares-Bezerra et al 2004). Os parasitos *Leishmania* apresentam deficiência de enzimas que sintetizam purinas. O alopurinol provavelmente inibe o metabolismo do parasito pela competição com o ATP (Van Voorhis 1990). São geralmente ineficientes na ausência do antimônio pentavalente (Blum et al 2004); no entanto, quando em combinação (alopurinol + antimoniais) a eficácia é aumentada (Esfandiarpour & Alavi 2002, Momeni & Aminjavaheri 2003).

O efeito do alopurinol em promastigotas de *L. braziliensis* foi relatado por Neal, Croft & Nelson, 1985.

### 1.6.3 Sitamaquina (WR6026)

A sitamaquina (WR6026), um análogo de pirimidina, foi desenvolvida pelo Instituto Walter Reed Army, EUA. Sua vantagem consiste em ser um fármaco de via de administração oral. A sitamaquina é rapidamente metabolizada, formando desetil e derivados 4-CH<sub>2</sub>OH, os quais podem ser responsáveis por sua atividade (Croft & Coombs 2003). O primeiro teste clínico com este fármaco para leishmaniose visceral ocorreu no Quênia, sendo empregado em altas doses (1 mg/Kg/dia) por quatro semanas. Nesta avaliação, 50% dos pacientes responderam ao tratamento com o fármaco (Sherwood et al 1994).

Alguns estudos clínicos têm mostrado níveis variados de eficácia. No Brasil, 67% dos pacientes foram curados de *L. chagasi*, quando tratados com 2 mg/Kg/dia durante 28 dias. A metaemoglobinemia é um efeito colateral comum e alguns pacientes desenvolveram nefropatias (Dietze et al 2001), o que parece ter limitado a continuidade de estudos.

### 1.6.4 Antifúngicos azólicos

Os azólicos ketaconazol, triazol, itraconazol e fluconazol agem em *Leishmania* spp. bloqueando a síntese de ergosterol (Croft & Yarley 2002) e são considerados fármacos de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses.

Em um estudo com controle de placebo realizado na Arábia Saudida, 209 pacientes portadores de leishmaniose cutânea causada por *L. major* receberam 200 mg de fluconazol diariamente durante seis semanas. Após três meses do final do tratamento, 79% e 34% dos pacientes que receberam fluconazol e placebo respectivamente tiveram cura das lesões (Alrajhi et al 2002).

A avaliação de ketaconazol, fluconazol, itaconazol, terbinafina e metranidazol em *L. infantum* mostrou uma variação na susceptibilidade aos fármacos. Nenhum desses azoles foi considerado mais efetivo que a terapia com o antimonito de meglumina (Gangneux et al 1999).

Os efeitos tóxicos mais frequentemente observados para os azoles foram náusea e vômito em dosagem superior a 10 mg/Kg/dia (Van Voorhis 1990)

### **1.6.5 Produtos naturais**

Muitos grupos de produtos extraídos da natureza têm revelado propriedades antiparasitárias com grande eficácia. Entre estes estão os alcalóides derivados de plantas, os terpenos e fenólicos (Kayser, Kiderlen & Croft 2003).

Para o tratamento das leishmanioses, estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* vêm testando compostos naturais em diferentes espécies, obtendo níveis variados de sucesso e revelando substâncias que podem vir a ser empregadas futuramente no tratamento das leishmanioses (Maes et al 2004, Gupta et al 2002, Alves et al 2003, Maes et al 2004, Singh et al 2005, Monzote et al 2007).

É importante lembrar que a maioria dos fármacos sintéticos é derivada de produtos naturais.

### **1.7 Associação de fármacos leishmanicidas**

As interações medicamentosas podem ocorrer entre fármacos ou outras substâncias químicas presentes no ambiente e como decorrência disso, as seguintes alternativas podem acontecer: indiferentismo farmacológico, quando cada uma das substâncias associadas age independentemente das demais e interações farmacológicas, quando um fármaco interfere com os outros, alterando o efeito esperado. Se a alteração apresentada for qualitativa, a resposta farmacológica é completamente diversa dos efeitos habituais dos medicamentos; se quantitativa, o efeito próprio do fármaco pode aumentar (sinergia), diminuir (antagonismo parcial) ou cessar (antagonismo total).

As sinergias podem ser classificadas em adição (quando os efeitos dos fármacos isolados são somados na associação) ou de potencialização (quando o efeito resultante é maior do que a simples soma dos efeitos isolados).

Tanto sinergia como antagonismo podem ser benéficos, inúteis ou prejudiciais. Interações benéficas justificam a utilização de associações medicamentosas para aumentar a eficácia (sinergia) ou corrigir algum efeito indesejável (antagonismo - efeito corretivo e antidotismo). Interações nocivas produzem efeitos adversos (decorrentes da sinergia ou antagonismo) ou diminuem a eficácia de um ou de ambos os elementos envolvidos (antagonismo) (Serpa, Castro & Teixeira 2004).

A prática de associação de fármacos é bastante usual e pode contribuir para aumentar a eficácia do tratamento e evitar e/ou adiar o surgimento de resistência. No caso das interações medicamentosas para as doenças infecto-parasitárias, essa prática é empregada com sucesso para o tratamento de malária, tuberculose, AIDS, bactérias, entre outras.

Para as leishmanioses, a Organização Mundial da Saúde preconiza a pesquisa que visa medicamentos administrados por via oral ou tópica (leishmanioses dermatópicas), que apresentem esquemas terapêuticos curtos, baixa frequência de efeitos adversos e baixo custo. A combinação de fármacos pode constituir alternativa terapêutica relevante para o tratamento das leishmanioses, pelo seu potencial de evitar e/ou adiar o surgimento de resistência, potencializar atividade, reduzir dose e tempo de tratamento e minimizar efeitos adversos (Croft & Coombs 2003). Há mais de uma década, alguns estudos sugerem que a associação entre fármacos leishmanicidas pode ser benéfica.

O isolado M2903 de *L. braziliensis* é considerado uma cepa naturalmente resistente ao ketaconazol. No entanto, foi observado aumento na susceptibilidade de promastigotas dessa cepa quando tratada com a combinação de ketaconazol e terbinafina (Rangel et al 1996).

Gangneux et al (1997) avaliaram a combinação da paromomicina (20 ou 50 mg/Kg/dia, durante 11 dias) com o Glucantime® (200 mg/Kg/dia, durante 11 dias) em camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* e compararam com a monoterapia. Houve diminuição da carga parasitária no fígado e baço de animais tratados com a paromomicina quando comparada com a do controle não tratado, porém, essa redução não foi superior à promovida pela monoterapia do antimoniato de meglumina. A combinação dos fármacos, no entanto, resultou em aumento da eficácia quando comparada com a obtida com os fármacos isolados, embora esse regime de associação não tenha sido capaz de eliminar completamente os parasitos do baço e fígado e tenha sido acompanhado de toxicidade para os animais (25% de morte).

Pacientes colombianos portadores de leishmaniose cutânea foram tratados com a formulação de paromomicina e gentamicina, o que resultou em uma taxa de cura de 64% após 20 dias de tratamento (Soto et al 2002).

A associação do paromomicina com o antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose cutânea não apresentou benefício quando comparada com os resultados obtidos com monoterapia com o antimonial (Soto et al 1998). No

entanto, essa mesma combinação se mostrou eficaz para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia e no Sudão (Bryceson 2001).

A avaliação do alopurinol e do Glucantime® isolados e combinados foi realizada em pacientes do Iran, com leishmaniose cutânea. Grupos de pacientes receberam 15 mg/Kg/dia de alopurinol por via oral por três semanas ou 30 mg/Kg/dia de Glucantime® por via intra-muscular por duas semanas ou essas mesmas doses em associação. A melhor resposta ao tratamento, considerando-se redução do tamanho da lesão em pelo menos 80%, ou eliminação completa, foi obtida para a associação alopurinol e Glucantime® (Esfandiarpour & Alavi 2002).

A associação alopurinol e antimoniato de meglumina também foi considerada eficaz no tratamento de pacientes não saudáveis com leishmaniose cutânea e essa terapia foi sugerida para estes casos (Momeni & Aminjavaheri 2003).

Em alguns estudos, a associação do fármaco com substância imunomoduladora tem mostrado sinergismo. O picrolive, um imunoestimulador e hepatoprotetor foi avaliado em hamsters infectados com *L. donovani*. O imunomodulador sozinho (10 mg/Kg) apresentou baixo potencial leishmanicida, no entanto, quando associado a baixas doses de miltefosina (25 mg/Kg) apresentou aumento na eficácia, de 45 para 86% após sete dias do fim do tratamento e de 32 a 64%, no 28º dia após o tratamento. O resultado obtido dessa associação foi tão expressivo quanto o obtido com a dose curativa de miltefosina (50 mg/Kg) (Gupta et al 2005).

A combinação do Pentostan com interferon gama (INF- $\delta$ ) tem promovido redução nas doses do antimonial, sendo sugerido seu uso como adjuvante no tratamento da leishmaniose visceral. Na Índia, onde se observam elevados níveis de resistência ao Pentostan, essa combinação tem sido limitada (Jha 2006).

O estudo de Ménez et al (2006) avaliou a interação entre miltefosina e anfotericina B e as conseqüências físico-químicas dessa associação para *L. donovani*. A incubação da associação miltefosina e anfotericina B em monocamadas de células Caco-2 promoveram fortes interações físico-químicas, como redução da permeabilidade celular induzida pela miltefosina, inibição de ambos os fármacos, e diminuição no transporte transepitelial de ambos os fármacos, sugerindo que o antagonismo entre miltefosina e anfotericina B possa ocorrer após administração. A interação *in vitro* mostrou indiferença na associação entre a miltefosina e a anfotericina B.

Sheifert & Croft (2006) obtiveram aumento de atividade de 7,22 vezes, em ensaio *in vivo* com camundongos Balb/c infectados com *L. donovani* e tratados com a associação miltefosina e paromomicina. Esta combinação não promoveu morte para os animais e foi considerada mais interessante que a associação entre miltefosina e anfotericina B, considerando custo e toxicidade. Nos ensaios *in vitro* em amastigota intracelular foi obtida indiferença nas associações entre miltefosina e anfotericina B, sitamaquina e paromomicina e algum sinergismo entre miltefosina e estibogluconato de sódio.

Um estudo realizado em Montes Claros, Minas Gerais, avaliou a eficácia da combinação de desoxicolato de anfotericina B (1 mg/Kg/dia) com antimoniato N-metil glucamina (20mg Sb<sup>5+</sup>/Kg/dia) por 7 dias ou 10 dias, em comparação com monoterapia de desoxicolato de anfotericina B (1 mg/Kg/dia) por 10 dias. Os índices de cura foram de 98,4% (61/62), 98,3% (58/59) e 85% (40/47) respectivamente, sugerindo que a combinação de antimonial pentavalente com anfotericina B pode ser um esquema bastante promissor para LV no Brasil (Carvalho, 2005).

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) está relacionado à imunopatogênese da leishmaniose cutânea, sendo expresso na lesão e encontrado em altos níveis no soro desses pacientes com essa doença. A pentoxifilina é uma xantina sintética que age inibindo o gene do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e potencializando a expressão da indução de óxido nítrico sintase (INOS), levando a produção de óxido nítrico (NO) (Hoebe et al 2001). Dez pacientes com leishmaniose mucosa, residentes no município de Corte da Pedra, Bahia foram tratados com 20 mg/Kg/dia de antimonial pentavalente e pentoxifilina na dose de 400 mg/Kg, 3 vezes/dia, por 30 dias. Nove desse pacientes apresentaram completa re-epitelização do tecido da mucosa até 90 dias após a terapia e não houve evidências de recidiva até um ano. Os autores indicam o uso da associação do antimônio e pentoxifilina para o tratamento de pacientes com leishmaniose mucosa refratária ao tratamento convencional (Lessa et al 2001). A eficácia dessa mesma associação em estudo controlado também foi confirmada mais recentemente em pacientes com leishmaniose mucosa (Machado et al 2007).

Báfica et al (2003) sugeriram o uso dessa associação pentoxifilina e antimônio pentavalente em pacientes brasileiros com leishmaniose cutânea refratário à monoterapia com o antimônio. O estudo de Sadeghiam & Nilforoushzadeh (2006) também apontou vantagem na associação entre o Glucantime® e pentoxifilina no

tratamento da leishmaniose cutânea no Iran e sugerem ainda, que essa combinação é mais benéfica do que a monoterapia com o antimônio.

As associações entre fármacos leishmanicidas parecem favorecer o tratamento, potencializando ou reduzindo a dose dos fármacos. Neste cenário, a combinação de drogas aponta para uma saída estratégica que atuaria evitando o desenvolvimento de resistência e possibilidade de esquemas de curta duração, com conseqüente aumento de aderência, redução de toxicidade e potencial redução de custo.

Os estudos realizados pelos principais grupos de pesquisadores envolvidos com o tema avaliaram principalmente espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. A combinação terapêutica entre os fármacos leishmanicidas tem sido proposta e recomendada pela OMS, principalmente com o objetivo de prevenir resistências. Entretanto, combinações seguras e eficazes devem ser estabelecidas antes de serem introduzidas na rotina prática.

Assim, a avaliação *in vitro* da associação do paromomicina com outros fármacos foi avaliada neste estudo a fim de fornecer subsídios para orientar as combinações terapêuticas para as espécies de *Leishmania* de importância médica no Brasil a serem avaliadas na clínica.



## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar alternativas terapêuticas para *Leishmania* de importância nosológica no Brasil.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a atividade leishmanicida em modelos *in vitro* e *in vivo* do antimoniato pentavalente produzido por Farmanguinhos-Fiocruz com o fármaco referência Glucantime®-Aventis.
- Avaliar a atividade da miltefosina sobre as quatro espécies de *Leishmania* de importância médica no país: *L. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.
- Identificar possíveis associações sinérgicas entre o sulfato de paromomicina e outros fármacos com atividade leishmanicida sobre *L. braziliensis* e *L. chagasi*, em modelo experimental *in vitro*.

### 3 Metodologia

#### 3.1 Parasitos e manutenção das cepas

Este estudo foi conduzido com as cepas de referência das seguintes espécies: *Leishmania braziliensis*, cepa WHO – MHOM/BR/75/M2903, *Leishmania chagasi*, cepa MHOM/BR/70/BH46, *L. amazonensis*, cepa IFLA/BR/1967/PH-8, *L. guyanensis* cepa MHOM/BR/1997/321-P e *L. donovani* cepa: MHOM/ET/1967/HU3. A caracterização de todas as espécies foi confirmada e todos os isolados encontram – se depositados no banco de cepas da Coleção de *Leishmania* spp. do Centro de Referência em Tipagem de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz.

As cepas das espécies dermatrópicas *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram mantidas através de passagens mensais e as espécies viscerotrópicas *L. chagasi* e *L. donovani*, através de passagens bimestrais em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou, de acordo com as normas adotadas pelo National Research Council e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os procedimentos que utilizaram animais (manutenção de cepas de *Leishmania*, retirada de macrófagos e ensaio *in vivo*) foram submetidos à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz e aprovados como protocolo P-0321/06 e licença L-0024/8).

Para recuperação e isolamento de amastigotas, foram obtidos fragmentos de lesões das espécies dermatrópicas e fragmentos de baço das espécies viscerotrópicas. Os fragmentos foram mantidos por 24h a 4°C em solução de NaCl 0,9%, contendo 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco ref.15140). Os fragmentos foram incluídos em meio de cultura Schneider's (Sigma ref. S9895), esterilizado por filtração em membrana de nylon 0.22µm, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF Gibco ref. 10270-106) inativado a 56°C por 30 minutos acrescido de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. Essas culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD (demanda bioquímica de oxigênio - FANEN, São Paulo, Brasil) a 26°C por 4 a 7 dias. As culturas dessas cepas de parasitos foram repicadas semanalmente nas condições de cultivo descritas acima. O número de passagens em meio de cultura variou de quatro a seis para as espécies dermatrópicas e até oito para as espécies visceral.

### 3.2 Fármacos

Os compostos leishmanicidas avaliados neste estudo foram: 1) sulfato de paromomicina (Antibioticos, Milão – Itália: 779 mg de sulfato de paromomicina), ressuspensa em água apirogênica e estéril e mantida a -20°C protegido da luz por até 15 dias; 2) antimoniato de meglumina - Glucantime® - Aventis (Aventis Pharma Ltda, Brasil - lotes: 300063 e 503822), contendo 81 mg/mL de antimônio pentavalente (Sb<sup>V</sup>), mantido ao abrigo da luz em pequenas alíquotas a -20°C, 3) miltefosina (Zentaris Inc. EUA) a 30mg, estocado a -20°C; 4) azitromicina (Zitromax® IV - Pfizer – Brasil). Cada frasco-ampola de pó para solução para infusão intravenosa, contém azitromicina diidratada equivalente a 500 mg de azitromicina. O conteúdo do frasco de azitromicina foi reconstituído em 4,8 mL de água para obtenção de uma solução de 100mg/mL e mantida em geladeira (2° – 8°C) ao abrigo da luz por no máximo sete dias após reconstituição; 5) desoxicolato de anfotericina B (anf B) - Anfotericin® (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Brasil), 50 mg, reconstituída em 10 mL e mantida sob refrigeração, protegida da luz, sendo utilizada até um mês após sua reconstituição, de acordo com as instruções do fabricante e 6) quatro lotes de antimoniato de meglumina sintetizados por Farmanguinhos - Fiocruz, Brasil, denominados TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03 e TAM 021/02. Os lotes de TAM (pó) foram estocados em temperatura ambiente até o uso, quando foram ressuspensos em água e aquecidos a 80°C para a solubilização e armazenados em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Todas as subseqüentes diluições empregadas foram preparadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis,EUA) no dia do ensaio.

### 3.3 Obtenção de formas amastigota-like de *Leishmania*

Promastigotas das espécies *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis* foram cultivadas em meio Schneider's, pH 7,2 acrescido de 10% de SBF, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina e mantidas em estufa BOD a 26°C até atingirem a fase estacionária de crescimento: 7° dia da curva de crescimento para *L. amazonensis*; 9° dia para *L. chagasi* e 6° dia da curva de crescimento para *L. guyanensis* e *L. braziliensis*. Promastigotas de *L. donovani* foram cultivadas em meio Novy, Mc Neal & Nicolle (NNN) bifásico, cuja fase sólida

foi constituída por agar sangue com 10% de sangue de coelho e a fase líquida por Schneider's pH 7,2 acrescido de 10% de SBF, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL, com fase estácionária no 6° dia da cultura. As promastigotas foram centrifugadas a 1000g durante dez minutos e ressuspendidas em meio Schneider's de acordo com Teixeira et al. (2002), com algumas modificações: *L. amazonensis* 32°C, pH 5,0, 5% de SBF por 7 dias; *L. chagasi* 35°C, pH 7,2, 10% de SBF por 6 dias; *L. guyanensis* 32°C, pH 5,0, 5% de SBF por 4 dias e *L. braziliensis* 32°C, pH 5,0, 5% de SBF por 5 dias. Os ensaios utilizando *L. donovani* foram realizados empregando-se a forma promastigota na fase estacionária (6° dia).

#### 3.4 Ensaio leishmanicida em modelo de cultivo de amastigota-like para *L. chagasi* e *L. amazonensis*

Este ensaio foi conduzido para avaliar previamente a atividade leishmanicida dos quatro lotes de antimoniato de meglumina (TAMs) sintetizados por Farmanguinhos sobre *L. chagasi* e *L. amazonensis*.

Formas amastigota-like foram cultivadas em meio Schneider's suplementado, nas concentrações de  $5 \times 10^7$  parasitas/mL de *L. chagasi* e  $2 \times 10^7$  parasitas/mL de *L. amazonensis* e expostos aos fármacos TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03, TAM 021/02 e Glucantime® (fármaco referência) nas concentrações de  $Sb^V$  de 5, 10, 50, 150 e 300 µg/mL e à anf B na concentração de 0,2 µg/mL, que foi empregada como fármaco controle. As amostras foram colocadas em placas de cultura de 96 poços (Sarsted, USA), em triplicatas e incubadas a 35°C ou 32°C, dependendo da espécie, como especificado acima. Após 3 dias, os parasitos presentes em cada poço foram contados em câmara de Neubauer™. Foram realizados três ensaios em triplicata cada um, em dias diferentes. O número de parasitos contados nos poços sem droga foi considerado como "100% de parasitos sobreviventes" (parasitos do grupo controle).

### 3.5 Avaliação da atividade leishmanicida dos fármacos sobre *Leishmania* infectando macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c.

#### 3.5.1 Obtenção dos macrófagos

Camundongos Balb/c machos com peso de aproximadamente 20 gramas foram inoculados por via intraperitoneal com 1,5 mL de solução de tioglicolato (3% - Biobrás ref. 1131) para estimulação da produção de macrófagos. Após quatro dias, os animais foram sacrificados e colocados em recipientes contendo álcool 70% para a descontaminação da pele, que foi a seguir aberta para exposição da cavidade peritoneal. Para obtenção das células, 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 resfriado foi injetado na cavidade peritoneal. Em seguida, foi aspirado o conteúdo da cavidade peritoneal com seringa de 5 mL e o material foi acondicionado em tubo de 50 mL e centrifugado a 300g durante 7 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio RPMI 1640 não suplementado. A contagem dos macrófagos foi realizada em câmara de Neubauer™, utilizando-se azul de "Trypan" (Sigma ref. T8154) a 10% para avaliação da viabilidade celular. A suspensão de células foi ajustada para  $4 \times 10^5$ /mL e distribuída em placas para cultura de células (Sarsted, TPP®/ Europa) com 24 poços. Ao fundo de cada poço foi colocado uma lamínula de vidro circular de 13mm (Glass Técnica/Brasil). As células foram deixadas para aderir às lamínulas durante duas horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, o meio de cultura foi aspirado e um mL de meio RPMI 1640 aquecido (32°C), suplementado com 10% de SBF, 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina foi acrescentado aos poços. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 24h.

#### 3.5.2 Infecção de macrófagos e ensaio leishmanicida

Para a infecção dos macrófagos com as formas amastigota-*like* foram utilizados parasitos das cinco espécies avaliadas. A infecção das células ocorreu na proporção de 10 parasitos por macrófago. Foram utilizados  $4 \times 10^5$  macrófagos/mL e  $4 \times 10^6$  parasitos/mL, em volume final de 500µl de meio RPMI1640 suplementado e aquecido a 32°C. A infecção ocorreu em 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4h. Após a aspiração do conteúdo de cada poço, foi adicionado um mL de meio RPMI 1640

suplementado, aquecido a 32°C, contendo as diferentes concentrações dos compostos avaliados isoladamente. Triplicatas de poços contendo macrófagos infectados receberam meios de cultivo sem drogas e nos ensaio onde a anf B não foi avaliada, esta foi considerada fármaco controle na concentração de 0,2 µg/mL. Após três, cinco ou sete dias de incubação com os fármacos em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, as lamínulas foram retiradas dos poços, lavadas em meio RPMI 1640 suplementado, em temperatura ambiente, fixadas em metanol e coradas com corante Giemsa 0,7% (2 gotas/mL de água tamponada), durante 15 minutos. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico, com objetiva de imersão (100x). Foram determinados o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas por 100 macrófagos em cada lamínula. A atividade leishmanicida dos fármacos foi avaliada através da fórmula:

$$I = AT \times 100 / AC$$

I = % de infecção de amastigotas em 100 macrófagos em relação ao controle sem drogas

AT = número de amastigotas em 100 macrófagos no grupo tratado

AC = número de amastigotas em 100 macrófagos no grupo não tratado (controle)

Três ensaios foram realizados em triplicata. Foram considerados somente os ensaios em que os controles atingiram pelo menos 80% de infecção. À partir dos valores encontrados, foram determinados as concentrações inibitórias de 50% e 90% - CI<sub>50/90</sub> de cada fármaco avaliado.

### 3.6 Ensaio de citotoxicidade da miltefosina para macrófagos murinos

Para estimar a concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) da miltefosina sobre os macrófagos murinos, foi empregado o método colorimétrico Alamar Blue™. Camundongos Balb/c machos foram estimulados intra-peritonealmente com 1,5 mL de solução de tioglicolato 3%. Após quatro dias, os macrófagos foram recolhidos através da lavagem da cavidade peritoneal com meio de cultura RPMI 1640. As células foram diluídas a 1x10<sup>6</sup>/mL e colocadas para aderir em placas de cultura de 96 poços a 1x10<sup>5</sup> células/poço em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Os macrófagos foram

expostos a 10 pontos de diluições seriadas (0,017 a 1000µg/mL) com miltefosina. Após 68h de incubação, 10µl de Alamar Blue™ foram adicionados em cada poço e as placas incubadas por mais 4h. A absorbância a 570 e 600nm foi medida simultaneamente. A densidade óptica foi determinada a 570 e 600nm em espectrofotômetro (BioSource, Inc., EUA). Três ensaios independentes em triplicata foram realizados para determinar a concentração citotóxica 50% da miltefosina. A densidade óptica na ausência de fármacos foi considerada o controle.

### 3.7 Determinação *in vitro* da associação entre o sulfato de paromomicina e outros fármacos sobre *L. braziliensis* e *L. chagasi*

#### 3.7.1 Avaliação do sinergismo

As interações binárias entre o sulfato de paromomicina e demais fármacos (miltefosina, Glucantime®, azitromicina e anf B) foram avaliadas usando o método “taxa fixa”, de acordo com Seifert & Croft (2006), modificado. Após os ensaios de padronização que possibilitaram a determinação dos valores das  $CI_{50}$  e os tempos ideais de ação dos fármacos, estes foram usados para definir a “concentração-topo” de cada fármaco, de modo que o valor da  $CI_{50}$  estivesse próximo do ponto central ( $CI_{50}$ ) dos seis pontos da diluição seriada de duas vezes. A “concentração-topo” de cada fármaco foi usada para preparar as soluções taxa-fixa nas razões de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 da paromomicina e do fármaco associado. À partir dessas proporções, foram preparadas soluções seriadas, pela repetição por seis vezes de diluições de duas vezes. O ensaio sobre amastigota intra-macrófagos foi conduzido conforme descrito nos itens 3.5.1 e 3.5.2. Para as associações que necessitaram de mais de três dias de ação dos fármacos, o meio de cultivo foi substituído por novo meio contendo as proporções dos fármacos após três dias para os ensaios com duração de cinco dias e após três e cinco dias para os ensaios com duração de sete dias. A atividade dos fármacos foi determinada através da contagem do número de macrófagos infectados e do número de amastigotas por 100 macrófagos em cada lamínula, determinando-se o valor do percentual de infecção de amastigotas em 100 macrófagos, em relação ao controle sem drogas (I) e calculando-se os novos valores das  $CI_{50/90}$ . Foram realizados três ensaios com cada concentração/proporção-fixada, em triplicatas.

### 3.7.2 Determinação do índice da concentração fracionada inibitória (CFI)

As concentrações fracionárias inibitórias (CFIs) foram calculadas, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{CFI da paromomicina} = \frac{\text{CI}_{50/90} \text{ da paromomicina em combinação}}{\text{CI}_{50/90} \text{ da paromomicina isolada}}$$

Após obter as CFIs foi calculado o somatório dessas concentrações, dado por:

$$\Sigma\text{CFIS} = \text{CFI da paromomicina} + \text{CFI do fármaco associado}$$

As CFIs e o  $\Sigma\text{CFIS}$  foram calculados para todas as soluções de proporções fixadas. A partir dos valores obtidos da média do  $\Sigma\text{CFIS}$ , os seguintes intervalos foram usados para classificar a natureza das interações de acordo com Seifert & Croft (2006):

$\Sigma\text{CFIS} \leq 0,5$ : indica sinergismo entre os fármacos associados

$\Sigma\text{CFIS} > 4$ : indica antagonismo entre os fármacos associados

$0,5 < \Sigma\text{CFIS} \leq 4$ : indica indiferença na associação

### 3.8 Avaliação *in vivo* dos lotes de antimoniato de meglumina sintetizados por Farmanguinhos (TAMs) em hamsters infectados com *L. braziliensis*

Amastigotas de *L. braziliensis* foram isoladas de fragmentos de lesões cutâneas presentes em patas de hamsters previamente infectados. Os fragmentos foram removidos, macerados em solução salina 0,9% e quantificados em câmara de Neubauer™. Cinquenta e quatro hamsters machos (*Mesocricetus auratus*), pesando em média 110 gramas, foram infectados com  $8 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$  amastigotas de *L. braziliensis* pela via subcutânea, na pata posterior. Cinco dias após a infecção, foi iniciado o tratamento dos animais com injeções intramuscular com cada lote das TAMs (20 mg/Kg/dia) durante 30 dias consecutivos. Os seguintes grupos foram



formados, contendo nove animais cada um: TAM 01/03 (grupo B); TAM 02/03 (grupo C); TAM 03/03 (grupo D), TAM 021/02 (grupo E), Glucantem®-Aventis (fármaco referência – grupo F) e grupo controle não-tratado (grupo A), que recebeu injeções intramusculares de água estéril. Para avaliar a evolução das lesões, essas foram acompanhadas semanalmente por oito semanas, através da medida realizada com auxílio de paquímetro. Os animais foram eutanaziados 30 dias após o fim do tratamento.

### 3.9 Análise dos dados

Os dados foram analisados, usando-se os programas de estatística MINITAB V. 13.1 e Prisma V. 4.0. A atividade das concentrações dos fármacos foi comparada pela análise de variância (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis, dependendo da distribuição das variáveis e as comparações entre os dados foram realizadas através dos testes de Dunn's ou Tukey. Os valores das concentrações inibitórias  $CI_{50/90}$  foram calculados por análise de regressão linear (MINITAB V. 13.1) quando a distribuição dos dados foi normal (método paramétrico) ou interpolação linear (Microsoft Office Excel 2003) segundo Huber & Koella, 1993, quando os valores não apresentavam distribuição normal (método não paramétrico).

Nas análises de interpolação linear para cálculo de  $CI_{50}$  foi empregada a seguinte equação:

$$CI_{50} = b - 50Ca/b - a + 50 - a Cb/b - a$$

b – percentual de redução maior que 50 (mais próximo)

a - percentual de redução menor que 50 (mais próximo)

$C_b$  - concentração da droga em b

$C_a$  - concentração da droga em a

Observação: os termos **a** e **b** na equação referem-se a percentual de redução nos ensaios com amastigotas intracelulares.

## 4 Resultados

4.1 Avaliação da atividade biológica do antimoniato pentavalente produzido por Farmanguinhos-Fiocruz com o fármaco referência Glucantime®-Aventis.

4.1.2 Atividade leishmanicida dos quatro lotes de TAMs, usando o modelo amastigota-like

As atividades dos quatro lotes de TAMs sintetizados por Farmanguinhos-Fiocruz, (TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03 e TAM 021/02), bem como do fármaco referência Glucantime®-Aventis, da anfB (fármaco controle) e controle sem adição de fármaco sobre formas amastigota-like de *L. chagasi* e *L. amazonensis* estão apresentadas na Figura 1

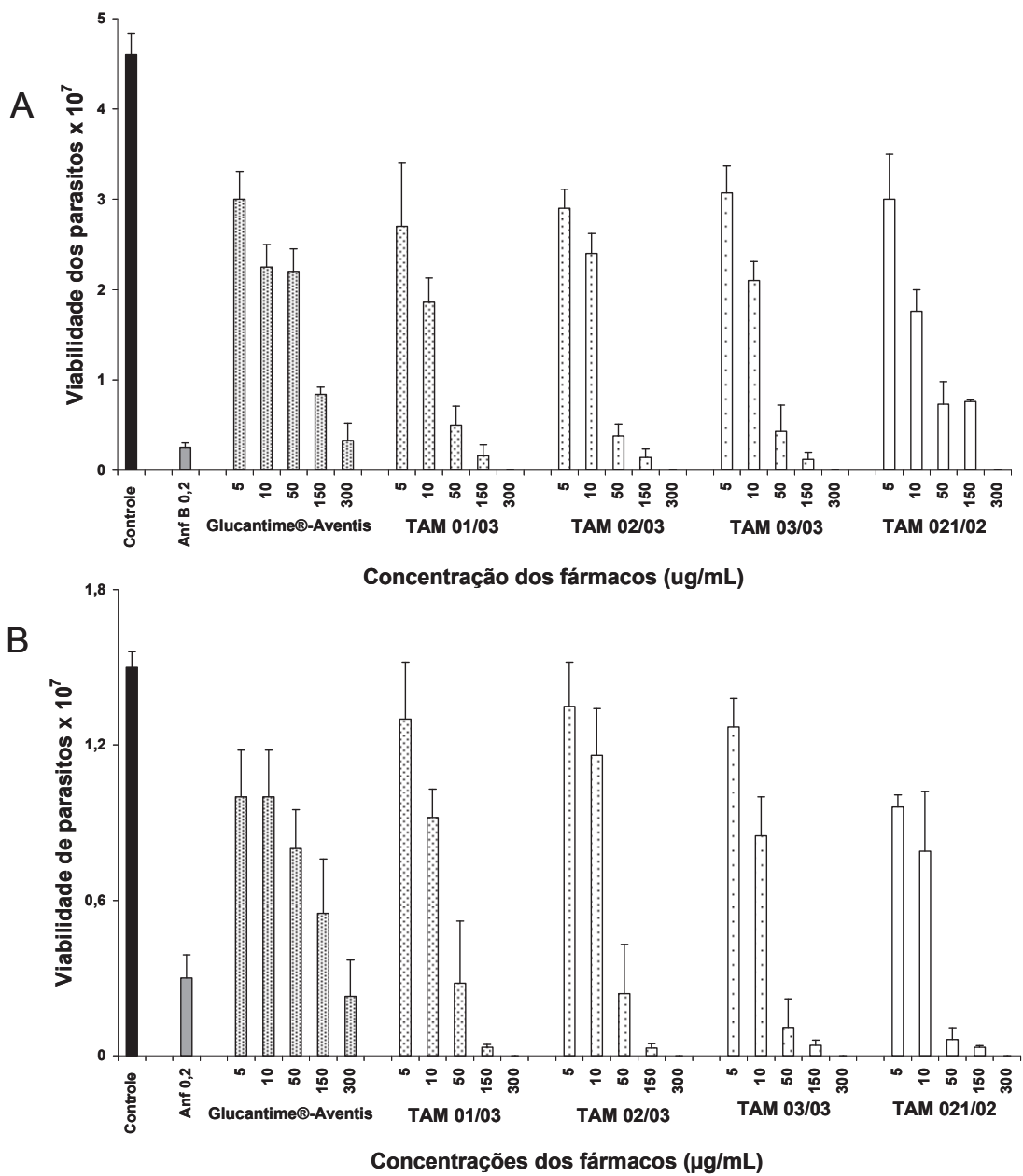


Figura 1- Atividade do antimoníato de meglumina glucantime®-Aventis (glu®) e dos quatro lotes de Farmanguinhos-Fiocruz (TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03 e TAM 021/02) contra formas amastigota-like de *L. chagasi* (A) e *L. amazonensis* (B). Anfotericina B 0,2µg/mL (AmB) foi usada como fármaco controle. Os valores apresentam a média ± desvio padrão de três ensaios, realizado em triplicata e em diferentes dias. Diferenças significativas para *L. chagasi* foram observadas a 10 µg/mL: controle sem fármaco x glu® e TAMs ( $p < 0,05$ ); 50 µg/mL e 150 µg/mL: controle sem fármaco x glu® e glu® x TAMs ( $p < 0,01$ ); 300 µg/mL: controle sem fármaco x glu® ( $p < 0,01$ ). Para *L. amazonensis*: 50 µg/mL: controle sem fármaco x glu® e TAMs ( $p < 0,05$ ); 150 µg/mL: controle sem fármaco x glu® e TAMs ( $p < 0,01$ ); 300 µg/mL: controle sem fármaco x glu® ( $p < 0,01$ ).

A atividade do antimoniato de meglumina (Glu® e TAMs) foi detectada para concentrações que variaram de 10 µg/mL a 300 µg/mL para *L. chagasi* (Fig 1A) e de 50 µg/mL a 300 µg/mL para *L. amazonensis* (Fig. 1B). Não foi observada diferença estatística significativa entre os quatro lotes de TAMs em nenhuma das concentrações avaliadas. Na concentração de 300 µg/mL das TAMs foram observados apenas fragmentos de amastigotas. O valor médio da inibição de parasitos observado para o fármaco controle (anfotericina B - Anf B – 0,2 µg/mL) foi de 94,6% para *L. chagasi* e 80% para *L. amazonensis*.

#### 4.1.3 Atividade leishmanicida das TAMs, usando o modelo de macrófagos infectados por amastigotas

Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c foram infectados com formas amastigota-like de *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e tratados com diferentes concentrações de glucantime®-Aventis e o lote TAM 01/03 sintetizado por Farmanguinhos-Fiocruz. A tabela 1 apresenta a comparação entre as concentrações inibitórias para cada fármaco e espécie de *Leishmania*.

Tabela 1 - Concentrações inibitórias (CI<sub>50</sub>) do Glucantime®-Aventis e do antimoniato de meglumina (lote TAM 01/03) sintetizado por Farmanguinhos-Fiocruz observadas em ensaios de amastigota intracelular para três espécies de *Leishmania*

Parasitas	CI <sub>50</sub> - µg/mL (IC) <sup>a</sup>		p valor
	Glucantime®-Aventis	TAM 01/03	
<i>L. (L.) chagasi</i>	<b>127,6</b> (106,2–148,9)	<b>26,3<sup>b</sup></b>	0,000
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<b>22,9</b> (18,2 – 27,5)	<b>15,4</b> (10,1 – 20,7)	0,092
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<b>24,2</b> (21,1- 27,4)	<b>12,1</b> (8,6 – 15,6)	0,021

<sup>a</sup> IC = Intervalo de confiança (95%)    <sup>b</sup> CI<sub>50</sub> determinada através de interpolação linear

A CI<sub>50</sub> obtida para *L. chagasi* foi de 26,3 µg/mL para TAM 01/03, determinada por interpolação linear e de 127,6 µg/mL (IC = 106,7 - 148,9 µg/mL) para Glucantime®, determinada por regressão linear ( $r^2 = 75,8\%$ ). Esses valores de CI<sub>50</sub> foram estatisticamente diferentes ( $p = 0,0000$ ), sendo a CI<sub>50</sub> da TAM 01/03 mais baixa do que a observada para o Glucantime®. Valores de CI<sub>50</sub> de 15,4 µg/mL (IC = 10,1 - 20,7 µg/mL) para TAM 01/03 e 22,9 µg/mL (IC = 18,2 – 27,5 µg/mL) para o

Glucantime® foram determinados para amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, através de regressão linear ( $r^2 = 67,0\%$  e  $83,7\%$  respectivamente), não sendo observada diferença estatística significativa entre esses ( $p = 0,092$ ). Os valores da  $CI_{50}$  encontrados para *L. (V.) braziliensis* foram:  $12,1 \mu\text{g/mL}$  (IC =  $8,6 - 15,6 \mu\text{g/mL}$ ) para TAM 01/03 e  $24,2 \mu\text{g/mL}$  (IC =  $21,1 - 27,4 \mu\text{g/mL}$ ) para Glucantime®, ambos estimados por regressão linear ( $r^2 = 85,3\%$  e  $92,9\%$ ). Esses valores foram estatisticamente diferentes ( $p = 0,021$ ), com valores da  $CI_{50}$  mais baixos encontrados para TAM 01/03.

A comparação das  $CI_{50}$  do Glucantime®-Aventis entre as espécies de *Leishmania* avaliadas mostrou diferença estatística significativa entre *L. chagasi* e *L. amazonensis* ( $p < 0,01$ ) e entre *L. chagasi* e *L. braziliensis* ( $p < 0,01$ ). No entanto, os valores das  $CI_{50}$  não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ) entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Para TAM 01/03, os valores das  $CI_{50}$  foram similares ( $p = 0,368$ ) entre as três espécies de *Leishmania* estudadas. A média dos valores da inibição de crescimento dos parasitos observados com o fármaco controle (Anf B,  $0,2 \mu\text{g/mL}$ ) foi de  $99,7\%$  para *L. chagasi*,  $99,5\%$  para *L. amazonensis* e  $98\%$  para *L. braziliensis*.

#### 4.1.4 Atividade leishmanicida *in vivo* das TAMs e do Glucantime®-Aventis, utilizando hamsters infectados com *L. braziliensis*

Grupos de hamsters foram infectados com suspensão de amastigotas de *L. braziliensis* e tratados com  $20 \text{ mg/Kg/dia}$  de cada um dos quatro lotes de TAMs ou Glucantime® por 30 dias consecutivos. A evolução das lesões foi acompanhada semanalmente por oito semanas, através da medida das mesmas com auxílio de paquímetro (Figura 2).

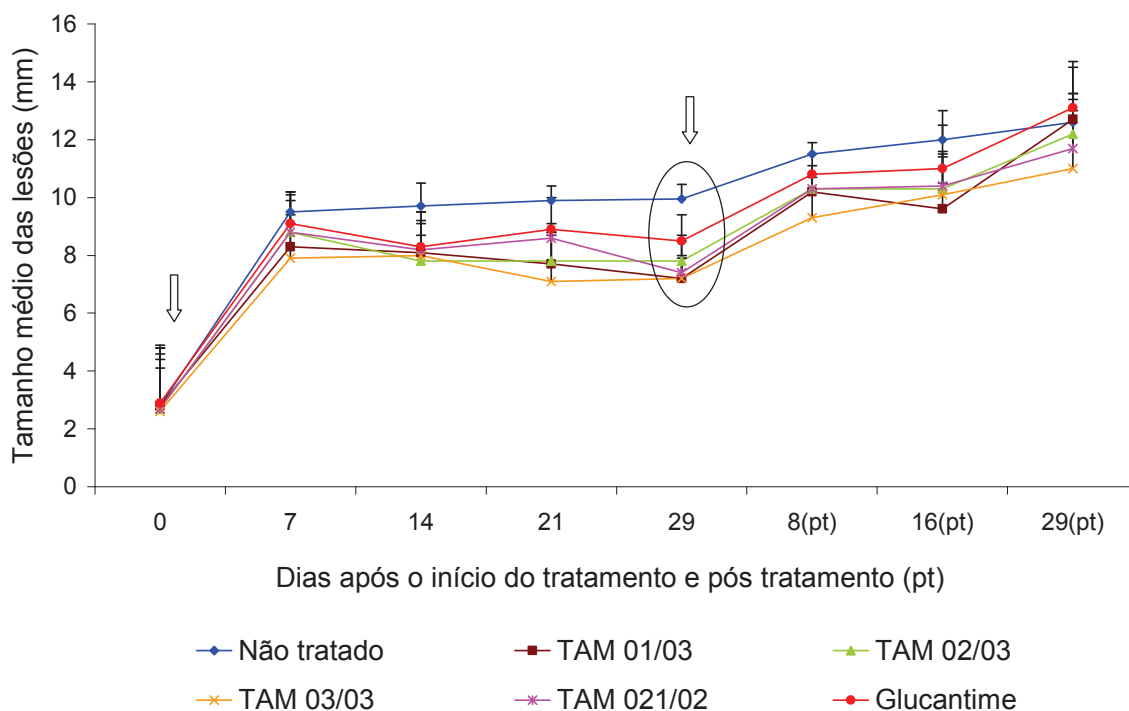


Figura 2 - Avaliação da atividade do antimoníato de meglumina em hamsters machos (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. braziliensis*. Os animais foram tratados via intramuscular com 20 mg Sb<sup>v</sup>/Kg/dia de antimoníato de meglumina (Glucantime® ou TAMs-Farmanguinhos) por 30 dias. As barras verticais representam a média e o desvio padrão do tamanho da lesão (diâmetro) de cada grupo. As setas indicam o início e o fim do tratamento. A elipse indica a atividade máxima entre os grupos tratados e o controle não tratado. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os quatro lotes de antimoníato de meglumina produzido pro Farmanguinhos e o fármaco referência Glucantime®.

Foram observados nódulos nas patas dos animais, cinco dias após a infecção (antes do tratamento), não sendo identificadas diferenças estatísticas significativas entre o tamanho desses nódulos entre os grupos ( $p = 0,854$ ). Após sete dias de tratameto, as lesões cutâneas permaneceram similares entre os grupos ( $p = 0,056$ ). No entanto, quatorze dias após o início do tratamento, as lesões do grupo não-tratado se tornaram maiores quando comparadas com as médias de medida de lesão cutânea do grupo de animais que recebeu TAM 02/03 ( $p < 0,05$ ) ou TAM 03/03 ( $p < 0,05$ ). Nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os quatro lotes de TAMs ou entre todos os TAMs e o Glucantime®. Esta situação persistiu até o 29º dia de tratamento, quando as lesões foram significativamente maiores no grupo não-tratado, comparado com as medidas das lesões do grupo tratado (TAM 01/03:  $p = 0,0000$ ; TAM 002/03:  $p = 0,002$ ; TAM 03/03:  $p = 0,0000$ ; TAM 021/02:  $p =$

021/02 e Glucantime®:  $p = 0,0298$ ). As médias das medidas de lesões cutâneas de todos os grupos voltaram a aumentar após o fim do tratamento. Diferenças estatísticas ainda foram significativas entre o grupo não-tratado, TAM 01/03 e TAM 03/03, oito e 16 dias após o fim do tratamento ( $p < 0,05$ ;  $p = 0,0357$  e  $p = 0,0357$ ;  $p = 0,0357$ , respectivamente). Vinte e nove dias após o final do tratamento, as lesões haviam aumentando em todos os grupos, mas as diferenças entre os grupos deixou de ser significativa ( $p = 0,157$ ).

#### 4.2 Atividade leishmanicida da miltefosina em macrófagos infectados por amastigotas de *Leishmania*

Macrófagos infectados com amastigotas das espécies avaliadas ou promastigotas (*L. donovani*) foram tratados com diferentes concentrações de miltefosina: 8,0 µg/mL a 0,19 µg/mL para *L. braziliensis*, 10,0 µg/mL a 0,16 µg/mL para *L. guyanensis* e *L. chagasi*; 5,0 µg/mL a 0,078 µg/mL para *L. amazonensis* e 0,5 µg/mL a 0,0039 µg/mL para *L. donovani*. Estas faixas de variação foram definidas através de experimentos prévios e quando disponíveis informações de literatura. O resumo dos valores das  $CI_{50/90}$  determinados para todas as espécies está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Concentrações inibitórias ( $CI_{50}$  e  $CI_{90}$ ) da miltefosina sobre diferentes espécies de *Leishmania*.

Parasitos	$CI_{50}$ µg/mL (IC) <sup>a</sup>	$CI_{90}$ µg/mL (IC) <sup>a</sup>
<i>L. (L.) chagasi</i>	<b>1,82</b> (0,65 – 3,00)	<b>5,05</b> (3,27 – 6,82)
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<b>1,31</b> (0,75 – 1,89)	<b>3,21</b> (2,19 – 4,24)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<b>2,20</b> (1,54 – 2,90)	<b>5,67</b> (4,67 – 6,67)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<b>1,64<sup>b</sup></b>	<b>6,05<sup>b</sup></b>
<i>L. (L.) donovani</i>	<b>0,09</b> (0,03 – 0,14)	<b>0,21</b> (0,14 – 0,27)

a: IC = intervalo de confiança; b:  $CI_{50/90}$  determinados por interpolação linear;

No modelo de amastigota intracelular para *L. chagasi*, a  $CI_{50}$  de miltefosina foi de 1,82 µg/mL (CI = 0,65 µg/mL - 3,00 µg/mL) e  $CI_{90}$  5,05 µg/mL (IC = 3,27 µg/mL - 6,82 µg/mL), determinadas por regressão linear ( $r^2 = 71,3\%$ ). A atividade da miltefosina sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi de 1,31 µg/mL (IC = 0,75 µg/mL - 1,89 µg/mL) e  $CI_{90}$  de 3,21 µg/mL (IC = 2,19 µg/mL - 4,24 µg/mL), determinada por regressão linear ( $r^2 = 79,8\%$ ). A  $CI_{50}$  de 2,20 µg/mL (IC = 1,54 µg/mL - 2,90 µg/mL) e  $CI_{90}$  de 5,67 µg/mL (IC = 4,67 µg/mL - 6,67 µg/mL) foi determinada para *L. braziliensis* por regressão linear ( $r^2 = 76,5\%$ ). Para *L. guyanensis* os valores foram 1,64 µg/mL ( $CI_{50}$ ) e 6,05 µg/mL ( $CI_{90}$ ) determinados por interpolação linear. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa (ANOVA) entre os valores das CIs ( $p = 0,295$ ) das espécies de *Leishmania* de importância médica no Brasil. Para *L. donovani* os valores das  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  foram de 0,09 µg/mL (IC = 0,03 µg/mL– 0,14 µg/mL) and 0,21 µg/mL (IC = 0,14 µg/mL–0,27 µg/mL) respectivamente, determinados por regressão linear ( $r^2 = 68,2\%$ ). Esses valores de CI determinados para a espécie do Velho Mundo *L. donovani* foram estatisticamente diferentes (ANOVA) daqueles encontrados para as demais espécies ( $p = 0,03$ )

A concentração citotóxica 50% ( $CC_{50}$ ) da miltefosina sobre macrófagos murinos, determinada através da técnica colorimétrica por Alamar Blue™ foi de 37,8 µg/mL. Este valor foi aproximadamente 21 vezes maior que a maior  $CI_{50}$  determinada para a atividade da miltefosina sobre as espécies de *Leishmania* avaliadas neste estudo.

#### 4.3 Associação *in vitro* da paromomicina e outros fármacos sobre amastigotas intracelular de macrófagos peritoneais

##### 4.3.1 Concentrações inibitórias de 50% e 90% determinados para os fármacos avaliados isoladamente

Macrófagos peritoneais estimulados de camundongos Balb/c foram infectados com formas amastigota-like de *L. braziliensis* e *L. chagasi* e expostos a variadas concentrações de paromomicina, anfotericina B, azitromicina, Glucantime®-Aventis e miltefosina durante 3, 5 e 7 dias. Os valores das  $CI_{50/90}$  em cada tempo avaliado e a comparação entre esses tempos estão apresentados na Tabela 3.



Tabela 3- Concentrações inibitórias (CI) de 50% e 90% ( $\mu\text{g/mL}$ ) após três, cinco e sete dias de exposição aos fármacos, determinados nos ensaios *in vitro* de macrófagos murinos infectados com amastigota-like de *L. braziliensis* e *L. chagasi* e tratados com Glucantime®-Aventis (Glu), miltefosina (Milt), paromomicina (PA), desoxicolato de anfotericina B (Anf B) e azitromicina (Azi). Entre parênteses estão os valores dos intervalos de confiança quando as CI foram determinadas por regressão linear. Abaixo, p valores (significativo  $p \leq 0,05$ ) entre os três tempos avaliados para cada espécie de *Leishmania*.

Fármacos	<i>L. braziliensis</i>										<i>L. chagasi</i>							
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			$CI_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			$CI_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			$CI_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	3 dias	5 dias	7 dias	3 dias	5 dias	7 dias	3 dias	5 dias	7 dias	3 dias	5 dias	7 dias	3 dias	5 dias	7 dias	3 dias	5 dias	7 dias
Glu	<b>40,2</b> (34,6 – 45,8)	<b>37,4</b> (28,5 – 46,3)	<b>21,7</b> (12,5 – 31,0)	<b>83,1</b> (71,3 – 94,8)	<b>69,2</b> (52,0 – 86,4)	<b>66,3</b> (49,7 – 82,9)	<b>172,4</b> (127,9-216,8)	<b>136,7</b> (85, – 188,0)	<b>48,5*</b> (27,9,1-440,5)	<b>359,8</b> (279,1-440,5)	<b>299,2</b> (217,4–381,0)	<b>165,9*</b> (117,4–216,8)	<b>48,5*</b> (27,9,1-440,5)	<b>359,8</b> (279,1-440,5)	<b>299,2</b> (217,4–381,0)	<b>165,9*</b> (117,4–216,8)		
Milt	<b>2,2</b> (1,5 – 2,9)	<b>0,81*</b> (0,2 – 0,8)	<b>0,34</b> (0,2 – 0,8)	<b>5,7</b> (4,7 – 6,7)	<b>4,0*</b> (2,1 – 3,9)	<b>0,9</b> (0,5 – 1,2)	<b>1,8</b> (0,7 – 3,0)	<b>2,8</b> (1,6 – 3,9)	ND	<b>5,0</b> (3,3 – 6,8)	<b>5,5</b> (3,8 – 7,1)	<b>0,61*</b> (0,2 – 0,8)	ND	<b>5,0</b> (3,3 – 6,8)	<b>5,5</b> (3,8 – 7,1)	<b>0,61*</b> (0,2 – 0,8)		
PA	<b>212,0</b> (161,1-262,9)	<b>156,0</b> (98,0-241,1)	<b>143,8</b> (75,9 – 211,6)	<b>429,8</b> (324,8-534,7)	<b>304,4</b> (211,1-397,7)	<b>270,1</b> (180,-359,9)	<b>207,3</b> (149,8-264,8)	<b>39,6*</b> (21,1-397,7)	ND	<b>487,8</b> (364,1-611,5)	<b>148,2*</b> (98,0-241,1)	ND	<b>487,8</b> (364,1-611,5)	<b>148,2*</b> (98,0-241,1)	ND			
Anf B	<b>0,04</b> (0,01 – 0,06)	<b>0,02*</b> (0,01 – 0,06)	<b>0,06</b> (0,04 – 0,09)	<b>0,11</b> (0,09 – 0,13)	<b>0,04*</b> (0,02 – 0,06)	<b>0,12</b> (0,09 – 0,15)	<b>0,04</b> (0,03–0,05)	<b>0,03</b> (0,02–0,04)	<b>0,01*</b> (0,01 – 0,02)	<b>0,09</b> (0,07 – 0,10)	<b>0,07</b> (0,05 – 0,08)	<b>0,03*</b> (0,01 – 0,04)	<b>0,09</b> (0,07 – 0,10)	<b>0,07</b> (0,05 – 0,08)	<b>0,03*</b> (0,01 – 0,04)			
Azi	<b>4,25</b> (1,32 – 9,9)	ND	ND	<b>15,4</b> (11,2 – 19,6)	<b>3,25*</b> (2,1 – 3,9)	<b>13,7</b> (3,3 – 24,1)	<b>14,9</b> (12,0 – 17,8)	<b>7,3</b> (2,7 – 11,9)	ND	<b>30,60</b> (25,7 – 35,5)	<b>23,2</b> (17,7 – 28,7)	<b>7,6</b> (1,7 – 13,4)	ND	<b>30,60</b> (25,7 – 35,5)	<b>23,2</b> (17,7 – 28,7)	<b>7,6</b> (1,7 – 13,4)		

\* - CI determinadas por interpolação linear ND = não determinado

Tabela – p valores (significativo  $p \leq 0,05$  – em destaque) calculados entre os diferentes tempos (dias) de ação dos fármacos das  $CI_{50}$  para as espécies avaliadas

Fármacos	<i>L. braziliensis</i>			<i>L. chagasi</i>		
	3 – 5	3 – 7	5 – 7	3 – 5	3 – 7	5 – 7
Glu	0,945	<b>0,001</b>	<b>0,008</b>	<b>0,020</b>	<b>0,000</b>	<b>0,013</b>
Milt	0,175	<b>0,021</b>	<b>0,014</b>	0,107	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
PA	0,109	0,233	0,081	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
Anf B	0,126	0,572	0,724	0,165	<b>0,023</b>	0,211
Azi	0,078	-----	-----	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>

Os resultados da Tabela 3 permitiram eleger os melhores tempos de ação dos fármacos para cada espécie e os valores das  $CI_{50/90}$  que foram utilizados como referência nos ensaios de associação. A escolha do tempo ótimo de ação dos fármacos se deu através da análise das diferenças estatísticas apontadas na tabela de p valores (Tabela 3), de modo a estabelecer o tempo comum para os dois fármacos associados, sem prejuízo para a ação de um ou outro. Quando não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos, foi adotado o menor tempo de ação dos fármacos. Assim, foram empregados os seguintes valores de  $CI_{50}$  e tempos de ação dos fármacos para as associações nos ensaios de *L. braziliensis*: 143,8 µg/mL (PA) + 21,7 µg/mL (Glu) - 7 dias; 143,8 µg/mL (PA) + 0,3 µg/mL (Milt) - 7 dias; 212,0 µg/mL (PA) + 0,04 µg/mL (anf B) - 3 dias e 212,0 µg/mL (PA) + 4,25 µg/mL (azi) - 3 dias. Para *L. chagasi*: 39,6 µg/mL (PA) + 136,7 µg/mL (Glu); 39,6 µg/mL (PA) + 2,8 µg/mL (Milt); 39,6 µg/mL (PA) + 0,03 µg/mL (anf B) e 39,6 µg/mL (PA) + 7,3 µg/mL (Azi). O tempo de ação dos fármacos nos ensaios de todas as associações para *L. chagasi* foi de 5 dias.

#### 4.3.2 Associações *in vitro* dos fármacos contra amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c

As associações *in vitro* foram avaliadas usando o método modificado de taxa fixa, e os dados foram analisados a nível das novas  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  obtidas. As Tabelas 4 e 5 apresentam os novos valores das  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  encontrados nas associações entre a paromomicina e demais fármacos leishmanicidas para *L. braziliensis* e *L. chagasi*, respectivamente.

Tabela 4- Valores das CI de 50% e 90% e seus respectivos intervalos do confiança (entre parênteses) obtidos para cada proporção entre a associação da paromomicina e outros fármacos para *L. braziliensis*

Proporções	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>
	Paromomicina		Anfotericina B	
5:0	ND	414,2 (385,4 – 443,1)	----	----
4:1	9,6 (7,1 – 12,4)	381,9 (352,8 – 421,0)	0,0004 (0,0002 – 0,0006)	0,0182 (0,0133 – 0,0227)
3:2	14,5 (10,9 – 17,9)	298,0 (235,2 – 330,7)	0,0018 (0,0013 – 0,0027)	0,0375 (0,0296 – 0,0454)
2:3	1,7 (1,1 – 3,8)	181,4 (137,5 – 225,4)	0,0005 (0,0004 – 0,0008)	0,0513 (0,0389 – 0,0638)
1:4	8,7(5,6 – 12,0)	86,8 (64,6 – 98,9)	0,0066 (0,0032 – 0,0104)	0,0655 (0,0488 – 0,0823)
0:5	----	----	0,0192 (0,0087 – 0,0222)	0,0768 (0,0541 – 0,0996)
	Paromomicina		Glucantime®	
5:0	21,3*	60,9*	----	----
4:1	ND	151,6 (121,6 – 171,6)	ND	5,7 (3,3 – 8,1)
3:2	12,7*	40,7*	1,3*	4,1*
2:3	10,2*	48,6*	2,3*	10,9*
1:4	15,5 (9,1 – 26,0)	58,1 (37,2 – 78,9)	9,3 (5,7 – 12,3)	35,0 (28,4 – 41,7)
0:5	----	----	27,4 (22,2 – 31,7)	64,2 (58,4 – 72,9)
	Paromomicina		Azitromicina	
5:0	69,1 (56,6 – 74,8)	537,1 (492,4 – 591,8)	----	----
4:1	67,3 (52,5 – 77,1)	478,2 (422,4 – 524,0)	0,3 (0,26 – 0,44)	2,4 (1,6 – 3,2)
3:2	114,7 (98,4 – 131,1)	407,5 (388,8 – 439,2)	1,5 (0,9 – 2,2)	5,5 (4,1 – 6,8)
2:3	76,9 (63,3 – 90,5)	305,1 (294,6 – 365,2)	2,3 (1,0 – 3,6)	9,2 (6,5 – 11,9)
1:4	39,9 (28,9 – 46,8)	164,9 (146,7 – 193,0)	3,2 (2,5 – 4,9)	13,2 (9,4 – 16,1)
0:5	----	----	7,8 (5,1 – 10,5)	18,4 (12,8 – 24,1)
	Paromomicina		Miltefosina	
5:0	ND	39,1*	----	----
4:1	ND	47,6	ND	0,2*
3:2	18,6*	31,2*	0,3*	0,4*
2:3	ND	35,9*	ND	1,1*
1:4	11,3*	23,5*	0,9	1,9*
0:5	----	----	3,5 (2,2 – 4,8)	8,1 (5,6 – 10,6)

ND = não determinado (os valores obtidos não atingiram a CI) \* CI determinadas através de Interpolação linear

Tabela 5- Valores das CI de 50% e 90% e seus respectivos intervalos do confiança (entre parênteses) obtidos para cada proporção entre a associação da paromomicina e outros fármacos para *L. chagasi*

Proporções	CI <sub>50</sub>		CI <sub>90</sub>	
	Paromomicina		Anfotericina B	
5:0	30,8 (21,1 – 40,4)	86,0 (51,4 – 100,7)	----	----
4:1	ND	66,8 (50,9 – 82,4)	ND	0,013 (0,009 – 0,016)
3:2	5,3*	18,8*	0,0019*	0,01*
2:3	ND	28,1(16,6 – 39,4)	ND	0,032 (0,019 – 0,045)
1:4	ND	6,2*	ND	0,019*
0:5	----	----	ND	0,02*
	Paromomicina		Glucantime®	
5:0	21,4 (15,1 – 32,9)	87,2 (53,8 – 92,5)	----	----
4:1	8,8*	56,2*	7,6*	48,5*
3:2	ND	36,7*	ND	84,2*
2:3	5,5*	26,8*	28,6*	138,9*
1:4	6,9 (3,9 – 11,9)	17,9 (11,7 – 24,0)	96,7 (77,9 – 125,6)	246,8 (211,6 – 282,1)
0:5	----	----	83,1 (68,8 – 105,9)	317,6 (271,2 – 334,0)
	Paromomicina		Azitromicina	
5:0	24,6 (19,5 – 39,6)	94,7 (65,1 – 124,3)	----	----
4:1	16,1(11,4 – 27,5)	79,9 (50,3 – 99,6)	0,7 (0,4 – 1,9)	3,7 (2,3 – 5,1)
3:2	7,9 (4,5 – 15,3)	63,4 (42,8 – 83,9)	0,9 (0,4 – 1,9)	7,8 (5,3 – 10,3)
2:3	13,2 (8,6 – 19,7)	43,2 (35,1 – 51,4)	3,7 (2,0 – 5,8)	11,9 (6,9 – 16,9)
1:4	1,9*	30,2*	1,5*	24,7*
0:5	----	----	4,4*	ND
	Paromomicina		Miltefosina	
5:0	9,0 (5,8 – 11,8)	40,3 (35,3 – 52,2)	----	----
4:1	2,1*	11,2*	0,04*	0,20*
3:2	ND	4,8*	ND	0,23*
2:3	ND	2,3	ND	0,16*
1:4	ND	0,4 (0,4 – 0,6)	ND	0,13 (0,11 – 0,15)
0:5	----	----	ND	0,25 (0,22 – 0,28)

ND = não determinado (os valores obtidos não atingiram a CI) \* CI determinadas através de Interpolação linear

As concentrações resultantes a partir da determinação das concentrações topo e das seis diluições seriadas que permitiram determinar as  $CI_{50/90}$  apresentadas nas Tabelas 4 e 5, se encontram nos anexos 1 e 2.

A partir dessas novas CIs foram calculadas as concentrações fracionadas inibitórias (CFI), e da relação da média do somatório dessas CFI ( $\Sigma CFI$ ) pelo número de proporções associadas (4:1, 3:2, 2:3, 1:4) foi determinada a natureza de cada associação. O resultado da média do  $\Sigma CFI$  e a classificação da natureza das associações entre a paromomicina e outros fármacos leishmanicidas avaliados para *L. braziliensis* e *L. chagasi* estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6- Média do  $\Sigma CFI$ s e avaliação da natureza das interações entre paromomicina (PA) e outros fármacos (anfotericina B – Anf B, Glucantime – Glu, azitromicina – Azi e miltefosina – Milt) em *L. braziliensis*

Associações	Média $\Sigma CFI \pm DP$ $CI_{50}$	Média $\Sigma CFI \pm DP$ $CI_{90}$	Avaliação
PA + Anf B	<b>0,100</b> $\pm$ 0,080	<b>0,945</b> $\pm$ 0,121	SIN - IND
PA + Glu	<b>0,287</b> $\pm$ 0,218	<b>0,487</b> $\pm$ 0,249	SIN - SIN
PA + Azi	<b>0,782</b> $\pm$ 0,263	<b>1,279</b> $\pm$ 0,139	IND- IND
PA + Milt	<b>1,358</b> $\pm$ 1,520	<b>1,142</b> $\pm$ 0,808	IND -IND

DP = desvio padrão     $\Sigma CFI = CFI \text{ PA} + CFI \text{ outro fármaco}$   
SIN = sinergismo      IND = indiferença      ANT = antagonismo

Tabela 7- Média do  $\Sigma$ CIFs e avaliação da natureza das interações entre paromomicina (PA) e outros fármacos (anfotericina B – Anf B, Glucantime – Glu, azitromicina – Azi e miltefosina – Milt) em *L. chagasi*

Associações	Média $\Sigma$ CIF $\pm$ DP CI <sub>50</sub>	Média $\Sigma$ CIF $\pm$ DP CI <sub>90</sub>	Avaliação
PA + Anf B	<b>0,197<sup>(*)</sup></b> $\pm$ ND	<b>0,464</b> $\pm$ 0,202	SIN - SIN
PA + Glu	<b>0,503</b> $\pm$ 0,330	<b>0,665</b> $\pm$ 0,194	IND - IND
PA + Azi	<b>0,479</b> $\pm$ 0,262	<b>0,884</b> $\pm$ 0,260	SIN- IND
PA + Milt	ND	<b>0,064</b> $\pm$ 0,038	SIN <sup>(**)</sup>

DP = desvio padrão  $\Sigma$ CIF = CIF PA + CIF outro fármaco ND = não determinado SIN = sinergismo  
 IND = indiferença ANT = antagonismo <sup>(\*)</sup> = considerando apenas a proporção 3 : 2 (PA : Anf B)  
<sup>(\*\*)</sup> = considerando apenas a avaliação pelo IC<sub>90</sub>

As interações foram classificadas como sinérgicas quando a média do  $\Sigma$ CIF foi  $\leq 0,5$ ; como antagônicas quando a média do  $\Sigma$ CIF foi  $> 4$  e indiferente quando a média do  $\Sigma$ CIF foi  $> 0,5$  e  $\leq 4$ . A associação do paromomicina com a anf B foi considerada sinérgica no  $\Sigma$ CIF da CI<sub>50</sub> com a média desse  $\Sigma$ CIF de 0,100 (DP = 0,080) a indiferente no  $\Sigma$ CIF da CI<sub>90</sub> com a média do  $\Sigma$ CIF de 0,945 (DP = 0,121) para *L. braziliensis*; já para *L. (L.) chagasi*, a natureza dessa mesma associação foi considerada sinérgica em ambas os  $\Sigma$ CIF da CI<sub>50</sub> e CI<sub>90</sub> [ $\Sigma$ CIF = 0,197 ;  $\Sigma$ CIF = 0,464 (DP = 0,202)]. No entanto, a avaliação do  $\Sigma$ CIF da CI<sub>50</sub> de *L. (L.) chagasi* considerou apenas o resultado obtido para a proporção 3:2 (PA:Anf B), uma vez que para as outras proporções, os valores obtidos do percentual de amastigotas/ 100 macrófagos ficaram abaixo da CI<sub>50</sub> (ver Tabela 5). Na associação entre a paromomicina e o Glucantime® foi obtido sinergismo para *L. braziliensis* [ $\Sigma$ CIF = 0,287 (DP = 0,218) – IC<sub>50</sub> e  $\Sigma$ CIF = 0,2487 (DP = 0,249) – IC<sub>90</sub>] e para *L. chagasi* a natureza da associação foi considerada indiferente para as concentrações inibitórias de 50% e 90% [ $\Sigma$ CIF = 0,503 (DP = 0,330) e CIF = 0,665 (DP = 0,194)]. A associação da paromomicina com a azitromicina foi avaliada em indiferente para *L. braziliensis* [ $\Sigma$ CIF = 0,782 (DP = 0,263) – IC<sub>50</sub> e  $\Sigma$ CIF = 1,279 (DP = 0,139) e sinérgica [ $\Sigma$ CIF = 0,479 (DP = 0,262) – IC<sub>50</sub>] a indiferente [ $\Sigma$ CIF = 0,884 (DP = 0,260) – IC<sub>90</sub>] para *L. chagasi*. Finalmente, para a associação entre paromomicina e miltefosina, a classificação foi indiferente para *L. braziliensis* [ $\Sigma$ CIF = 1,358 (DP =

1,520) – IC<sub>50</sub> e  $\Sigma$ CIF = 1,142 (DP = 0,808) e sinérgica para *L. chagasi*, considerando-se os resultados da média do  $\Sigma$ CIF obtidos para os valores da CI<sub>90</sub>. Os valores obtidos para o percentual de amastigotas/100 macrófagos ficaram abaixo da CI<sub>50</sub> para essa associação (Tabela 5).

## 5 Discussão

### 5.1 Atividade *in vitro* e *in vivo* do antimoníato de meglumina sintetizado por Farmanguinhos-Fiocruz, Brasil, contra *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*

Este trabalho avaliou alternativas para o tratamento das *Leishmania* de importância médica no Brasil.

Apesar da toxicidade dos sais de antimônio pentavalente, estes permanecem como fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses em muitos países, devido a sua eficácia e custo relativamente baixo, quando comparado com alternativas terapêuticas disponíveis.

Os quatro lotes de antimoníato de meglumina (TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03 e TAM 021/02) foram preparados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Farmanguinhos-Fiocruz, Rio de Janeiro. O processo dessa síntese foi iniciado usando N-metilglucamina em dietilamina aquosa, na presença de pentacloreto de antimônio. O composto foi então precipitado pela adição suficiente de etanol. Esse procedimento constituiu uma síntese alternativa de antimoníato de meglumina.

No primeiro momento, foi realizada a comparação dos quatro lotes de meglumina-Farmanguinhos com o fármaco referência Glucantime®-Aventis. Devido à simplicidade o ensaio de amastigota-*like* e também por que o ensaio dispensa o uso de animais, este modelo foi escolhido para essa avaliação inicial. Como esse modelo mostrou que os quatro lotes apresentavam atividade *in vitro* semelhante, somente um dos lotes (TAM 01/03) foi testado em ensaio de macrófagos para determinação das  $CI_{50}$ .

A utilização das formas amastigotas e não de promastigotas nos ensaios axênicos, foi escolhida por esta forma representar o estágio mais relevante na infecção. Promastigotas e amastigotas se diferem nos parâmetros bioenergéticos, incluindo a utilização de ácidos graxos e oxidação de enzima de ácidos graxos, enzimas glicolíticas e glicossomos. Em amastigotas, a expressão de genes e a fosforilação de proteínas são reguladas, assim com as proteinases, nucleases e a expressão de proteínas de membrana, incluindo gp63, LPG e metaloproteinases. Assim, a susceptibilidade a drogas em modelos que utilizam amastigotas e promastigotas pode ser diferente (Callahan et al 1997).



As formas amastigotas axênicas são morfológica e bioquimicamente semelhantes às amastigotas obtidas de lesões (Pane et al 1993). Os testes realizados para a obtenção das condições ideais de transformação de formas amastigota-*like* obtidas para este estudo partiram do trabalho de Teixeira et al (2002). No entanto, foram necessárias algumas modificações dos protocolos deste estudo para duas das três espécies avaliadas (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*), para se atingir as condições ótimas de obtenção das amastigota-*like*. Para a espécie *L. chagasi*, não foram necessárias adaptações.

De acordo com Gupta (2001), alguns critérios devem ser avaliados para caracterização das formas amastigotas obtidas em culturas axênicas, entre eles, morfologia, infectividade *in vivo* e *in vitro*, virulência e transformação cíclica. As amastigota-*like* obtidas neste trabalho infectam macrófagos em percentual elevado. Observamos que a infectividade *in vitro* em modelo de macrófagos murinos foi maior do que aquela obtida com formas promastigotas. Debrabant et al. (2004) também observaram que macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. donovani* apresentavam maior carga parasitária que aqueles expostos a promastigotas. Quando hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram inoculados na pata com amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* obtidas no Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou, a infecção foi estabelecida. Em microscopia de luz, foi possível acompanhar a transformação gradativa das formas promastigotas flageladas de todas as espécies estudadas em formas típicas de amastigotas aflageladas até obtenção de uma população homogênea. Além disso, quando as formas transformadas foram submetidas a condições de cultivo de promastigotas, elas foram capazes de reverter para essa forma flagelada.

Nos ensaios de amastigotas intracelulares, três espécies - *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* - foram avaliadas e o valor da  $CI_{50}$  obtidos (Tabela 1) ficaram abaixo da  $CI_{50}$  tóxica para macrófagos, que foi maior do que 300 µg/mL para cada um dos quatro lotes.

A comparação das  $CI_{50}$  de Glucantime®-Aventis entre as leishmanias avaliadas apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as espécies causadoras de leishmaniose tegumentar - *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e visceral - *L. chagasi*, mas não entre as duas espécies causadoras de leishmaniose tegumentar. No entanto, para os valores de  $CI_{50}$  determinados para a TAM 01/03 não houve diferença de atividade entre as espécies dermatrópicas e a *L. chagasi* (Tabela 1). Na comparação dos valores de  $CI_{50}$  determinados para Glucantime®-

Aventis e TAM 01/03, diferenças estatísticas foram observadas entre *L. chagasi* e *L. braziliensis*, sendo os menores valores obtidos quando os parasitos foram expostos a TAM 01/03.

O Glucantime®-Aventis foi testado na sua formulação comercial, que contém (cada ampola de 5 mL) antimoniato de N-metilglucamina em veículo constituído de metabissulfato de potássio, sulfito de sódio e água. Já na formulação do insumo farmacêutico ativo (IFA) de Farmanguinhos, não havia veículo ou preservante. O composto foi solubilizado em água, em banho maria (ver metodologia item 3.2). Pode ser que o veículo do Glucantime®-Aventis em interação com as propriedades intrínsecas dos parasitos de cada espécie tenha promovido essa diferença. Infelizmente, a Aventis não forneceu o veículo e/ou antimoniato de N-metilglucamina sem aditivos para que pudéssemos avaliar essa possibilidade. O preservativo do Penstostan®, o 4-cloro-3-metilfenol (clorocresol) interfere na ação deste fármaco em ensaios de promastigota e amastigotas intracelulares (Roberts & Rainey 1993, Ephros, Waldmann & Zilberstein 1997).

O desenvolvimento de fármacos genéricos como alternativa para o tratamento das doenças negligenciadas é uma das táticas para programas de controle de doenças. O preço e a sustentabilidade da produção de fármacos são pontos-chave, que podem facilitar as estratégias de controle ou ainda, colocar em risco a vida dos pacientes. Além disso, a qualidade do fármaco precisa ser cuidadosamente avaliada, principalmente a grande variação de qualidade e concentração de antimônio pentavalente observada ter em diferentes lotes. É importante notar que a atividade obtida com os quatro lotes de antimoniato sintetizados por Farmanguinhos foi reprodutível.

Em 2002, o Ministério da Saúde brasileiro recebeu notificação de centro de saúde pública da elevada frequência de efeitos adversos relatados por pacientes que foram tratados com o antimoniato de meglumina produzido pela Eurofarma. A investigação epidemiológica e clínica levou à análise físico - química dos lotes que resultou na detecção de metais pesados (Silva Junior 2001). Romero et al (2003) também relataram elevada frequência de reações na pele de pacientes tratados com determinados lotes de antimoniato de meglumina, que continham níveis elevados de metais pesados.

O tamanho das lesões de hamsters infectados com *L. braziliensis* foi significativamente reduzido pelo tratamento com as TAMs e com o Glucantime®-Aventis (Figura 3), mas estes fármacos, na dose de 20 mg/Kd/dia de Sb<sup>v</sup> foram

incapazes de eliminar a lesão, embora estas tenham se tornado significativamente menores do que as lesões dos animais do grupo controle não tratado. Neste trabalho, a carga parasitária não foi avaliada, mas estudos prévios mostraram que o antimoniato de meglumina não elimina totalmente as leishmanias de hamsters dourados infectados com *L. panamensis* tratados com 20 ou 40 mg/Kg/dia durante 20 dias (Travi, Martinez & Zea 1993).

Os resultados *in vitro* e *in vivo* mostraram que as TAMs foram tão ativas quanto o fármaco referência Glucantime®-Aventis contra as espécies de *Leishmania* de importância médica no país. No entanto, outras etapas são necessárias para completar o desenvolvimento de um fármaco genérico. Cabral et al (2008), promoveram mudanças na síntese de antimoniato de meglumina, que levaram à formulação de um composto estável e com aumento no percentual de Sb<sup>III</sup>, considerado ser a forma ativa dos antimoniais (Serenio et al 1997, Miekeley et al 2002).

Qualidade no controle da produção de lotes, análises químicas e estudo de bioequivalência poderão ser suficientes para a recomendação de um produto genérico, assim como o baixo custo em relação à alternativa de marca registrada. Estudos clínicos para assegurar a eficácia e segurança do antimoniato de meglumina sintetizado por Farmanguinhos poderão complementar a análise realizada neste estudo.

## 5.2 Atividade *in vitro* da miltefosina contra *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*

A utilização da miltefosina no tratamento das leishmanioses trouxe entusiasmo para a comunidade científica, uma vez que se trata de um fármaco eficaz para essas doenças e que tem via de administração oral. Este fármaco surgiu como alternativa e hoje está licenciado na Índia para o tratamento da leishmaniose visceral.

A atividade e propriedade da miltefosina foram bem estudadas para as espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, principalmente em *L. donovani*. Para as espécies ou cepas do Novo Mundo, inclusive Brasil, as informações são limitadas.

Assim, a atividade da miltefosina foi avaliada para as espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar e visceral de maior impacto médico no Brasil: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. chagasi* (Tabela 2).

A  $CC_{50}$  da miltefosina (37,8  $\mu\text{g/mL}$ ) para os macrófagos murinos foi aproximadamente seis vezes maior do que a determinada para a maior CI ( $CI_{90} = 6,05 \mu\text{g/mL}$  - *L. guyanensis*). Este resultado está de acordo com o observado por Yardley et al (2005) que encontraram ser  $> 30 \mu\text{g/mL}$ .

Yardley et al (2005) foram os primeiros a comparar a atividade da miltefosina em isolados de pacientes infectados com espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo. Os autores encontraram uma variação significativa na sensibilidade da miltefosina entre as espécies prevalentes no Peru, que tiveram as concentrações efetivas de 50% ( $CE_{50}$ ) variando:  $> 30 \mu\text{g/mL}$  a 21,3  $\mu\text{g/mL}$  para isolados de *L. braziliensis*,  $> 30 \mu\text{g/mL}$  a 8,4  $\mu\text{g/mL}$  para isolados de *L. guyanensis*,  $> 3,4 \mu\text{g/mL}$  a 1,9  $\mu\text{g/mL}$  para *L. lainsoni* e  $> 30 \mu\text{g/mL}$  para *L. mexicana*. Os isolados de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram considerados resistentes à miltefosina. Para a cepa de *L. braziliensis* (M 2930) avaliada nesta tese, o valor da  $CI_{50}$  ficou muito abaixo ( $CI_{50} = 2,2 \mu\text{g/mL}$ ) do encontrado para as diferentes cepas da mesma espécie, já para *L. guyanensis* os valores ficaram mais próximos ( $CI_{50} = 1,64 \mu\text{g/mL}$ ).

O estudo que avaliou a eficácia da miltefosina em pacientes com leishmaniose cutânea mostrou que o tratamento com este fármaco obteve sucesso para os casos de leishmaniose por *L. panamensis* na Colômbia, mas não para leishmaniose devido a *L. braziliensis* na Guatemala (Soto et al 2004).

Para os isolados de *L. donovani* provenientes do Nepal, no estudo de Yardley et al 2005, foi registrada uma variação na sensibilidade a miltefosina da ordem de 0,04  $\mu\text{g/mL}$  a 8,0  $\mu\text{g/mL}$  e um único isolado apresentou  $DE_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ . Para a cepa controle de *L. donovani* (HU3), o valor da  $DE_{50}$  foi de 8,7  $\mu\text{g/mL}$  contrastando com o achado da presente tese que determinou sensibilidade aproximadamente 100 vezes menor ( $IC_{50} = 0,09 \mu\text{g/mL}$ ) para esta mesma cepa (Tabela 2).

No trabalho de Yardley et al (2005) as cepas foram mantidas em condições diferentes das adotadas neste estudo. Há algumas evidências de que o tipo de meio de cultivo pode afetar a infectividade do parasito (Dey et al 2002).

Escobar et al 2002 observaram variação na sensibilidade de diferentes espécies de *Leishmania* para a miltefosina em modelo *in vitro*, sendo obtida a seguinte ordem de sensibilidade: *L. donovani*  $>$  *L. aethiopica*  $>$  *L. tropica*  $>$  *L. mexicana*  $>$  *L. panamensis*  $>$  *L. major*.

Diferentemente dos achados da literatura, não foi obtida diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,295$ ) entre as espécies prevalentes no Brasil para a sensibilidade a miltefosina, porém entre *L. donovani* e *L. chagasi*, essa

diferença foi evidenciada ( $p = 0,03$ ). A comparação das CI entre as cepas causadoras da leishmaniose visceral mostra que foi necessária uma concentração aproximadamente 20 vezes maior de miltefosina para atingir a  $CI_{50}$  ou  $CI_{90}$  de *L. chagasi* ( $CI_{50} = 1,82 \mu\text{g/mL}$ ;  $CI_{90} = 5,05 \mu\text{g/mL}$ ) em relação a *L. donovani* ( $CI_{50} = 0,09 \mu\text{g/mL}$ ;  $CI_{90} = 0,21 \mu\text{g/mL}$ ).

Os estudos que avaliaram a sensibilidade da *L. donovani* têm mostrado se tratar da espécie mais sensível à miltefosina, com  $CI_{50}$  variando entre 1,2 a 4,6  $\mu\text{M}$  em ensaios de amastigota (Escobar et al 2002). Os trabalhos mostram também uma grande variação na sensibilidade do fármaco entre diferentes cepas dessa espécie (Yardley et al 2005).

Taxas de cura da ordem de 95% e 94% foram obtidas em pacientes com calazar na Índia, após administração oral da miltefosina em estudos de fase II e III.

Um estudo recente comparou a eficácia da miltefosina oral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *L. amazonensis* com o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®). Na pesquisa de amastigota em esfregaços de lesão, os animais tratados com miltefosina apresentaram todos os resultados negativos, já o grupo tratado com Glucantime apresentou positividade parasitológica. A cultura para leishmânia foi negativa para os animais tratados com miltefosina, mas todas foram positivas para o grupo tratado com antimonial e no ensaio de diluição limitante, não houve crescimento de parasitos para ambos os grupos. No entanto, a morte de cinco animais em um grupo de 15 ocorreu no grupo miltefosina o que foi atribuído ao processo de gavagem na administração oral do fármaco. O trabalho concluiu que a miltefosina apresentou atividade semelhante, senão maior que Glucantime no tratamento da leishmaniose cutânea experimental causada por esta espécie (Costa Filho et al 2008).

A variação da resposta clínica aos fármacos leishmanicidas é um problema persistente na terapêutica das leishmanioses. Os ensaios de avaliação da sensibilidade da miltefosina em espécies brasileiras indicam um comportamento homogêneo na sensibilidade para a miltefosina, fica então a expectativa da associação entre este fármaco e outros leishmanicidas.

### 5.3 Associações *in vitro* entre o sulfato de paromomicina e outros fármacos determinados para *L. braziliensis* e *L. chagasi*

O estudo da associação entre os fármacos leishmanicidas objetivou identificar combinações que possam potencializar a atividade da paromomicina e descrever uma matrix de padrões de interações para os fármacos. Sinergismo, indiferença (aditividade) e antagonismo são resultados que se pode esperar das interações fármaco - fármaco.

O sulfato de paromomicina vem apresentando atividade leishmanicida eficaz tanto no tratamento da leishmaniose tegumentar como visceral. Além disso, o potencial de uma formulação tópica que já foi testada em modelo experimental *in vivo* apresentando resultados promissores fez com que este fármaco fosse selecionado para os ensaios de associação deste estudo. As combinações terapêuticas devem ocorrer preferencialmente entre fármacos com diferentes mecanismos de ação, com o intuito de aumentar a eficácia e reduzir a possibilidade de desenvolvimento de resistência aos compostos.

O método de taxa fixa adotado neste estudo para determinar a natureza das interações entre os fármacos foi originalmente desenvolvido para estudos de associações entre fármacos que agem em bactérias (Hall, Middleton & Westmacott 1983) e as vantagens do seu emprego consistem no fato de que as variações nas CI não afetam drasticamente os cálculos da concentração fracionada inibitória (CFI) e poucas e simples etapas são necessárias.

O método taxa fixa depende das concentrações prévias dos fármacos determinadas isoladamente. A partir desses valores uma concentração inicial de cada fármaco é selecionada. Assim se tem uma variação na concentração dos fármacos ao mesmo tempo em que se tem uma concentração pré determinada.

A Tabela 3 apresenta os valores de  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  determinadas para cada uma das espécies avaliadas em diferentes tempos de atividade. Esses valores serviram de referência na escolha das  $CI_{50}$  para as associações e poderão orientar futuros estudos de outras associações para *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Observa-se uma variação elevada nos valores dos intervalos de confiança para algumas das CI determinadas. No entanto, deve-se considerar a limitação do método, que consiste em contar em microscópio de luz os macrófagos e as amastigotas no seu interior, inserindo aí variações de contagem de observador para observador, apesar das tentativas de padronização desse processo. Outro problema que pode estar



relacionado é a contagem dos parasitos na etapa de infecção realizado em câmara de Neubauer. Sabe-se que a taxa de infecção dos macrófagos interfere na atividade do fármaco. Atualmente, está em fase de padronização no LPC a técnica do *Real Time* que será empregada na quantificação de DNA de amastigota nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Espera-se poder melhorar as variações encontradas nesse tipo de ensaio.

A escolha dos tempos avaliados seguiu os determinados no estudo de Seifert & Croft (2006), que investigaram a associação entre a miltefosina com outros fármacos leishmanicidas. A lógica adotada pelos autores foi a de que o tempo de associação prevalente seria aquele do fármaco associado à miltefosina. No presente trabalho, foi estabelecido uma tabela de p valores (Tabela 3) que apontou as diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tempos. Sendo assim, foram escolhidos os tempos ótimos para ambos os fármacos associados sem que houvesse prejuízo de atividade para um ou outro. Apenas para as determinações dos tempos de *L. chagasi* não foi obtida a  $CI_{50}$  da paromomicina para sete dias de ação do fármaco, pois a atividade neste tempo foi elevada. Sendo assim, o tempo máximo de ação determinado foi de 5 dias e para os demais fármacos avaliou-se a tabela de p valores.

Devido a critérios de escolha de tempo de ação, os determinados neste estudo, diferenciaram dos de Seifert & Croft (2006), considerando-se também que as avaliações foram realizadas em espécies diferentes de *Leishmania*.

Neal & Croft (1984) observaram em um estudo de determinação das condições do ensaio de amastigota intracelular em *L. donovani* que os macrófagos tratados com estibogluconato de sódio ou antimoniato de meglumina são limpos de amastigotas do seu interior com sete dias de exposição aos fármacos. No entanto, no presente estudo não foi observado esse efeito para o Glucantime em *L. chagasi*, sendo obtido  $CI_{50}$  de 48,5 µg/mL.

A Tabela 3 mostra ainda, variação da sensibilidade aos fármacos para as duas espécies avaliadas. Os maiores valores de  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  foram obtidos para o Glucantime e paromomicina por ambas as espécies (*L. braziliensis* e *L. chagasi*). Neal & Croft (1984) também obtiveram valores das  $CI_{50}$  mais elevados para estes dois fármacos em ensaio de amastigota intracelular para *L. donovani* em comparação com outros fármacos leishmanicidas. A atividade da miltefosina e anfotericina B ficou mais próxima entre as duas espécies.

Os valores das  $CI_{50}$  encontrados por Yardley et al (2005) para as diferentes cepas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes do Peru ( $> 30 \mu\text{g/mL}$ ) ficaram muito acima do encontrado neste estudo para esta mesma espécie ( $CI_{50} = 2,2 \mu\text{g/mL} - 3$  dias). A variação nas condições de trabalho pode interferir nos resultados de avaliação de fármacos. Além disso, no presente estudo foi avaliada a cepa de referência de *L. braziliensis* (M2903) que está bem adaptada aos meios de cultivo utilizados e o estudo citado acima, avaliou cepas recém isoladas de pacientes, o que provavelmente acarretou diferenças de sensibilidade.

Os valores das  $CI_{50}$  determinados para a azitromicina sobre *L. braziliensis* ( $CI_{50} = 4,25 \mu\text{g/mL} - 3$  dias) e *L. chagasi* ( $CI_{50} = 14,9 \mu\text{g/mL} - 3$  dias) foram próximos aos encontrados no estudo de Silva-Oliveira, Morais-Teixeira & Rabello (2008) -  $2,18 \mu\text{g/mL}$  e  $6,12 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Para *L. major* foi obtida  $CI_{50}$  de  $12 \mu\text{g/mL}$  em modelo de amastigota intracelular (Krolewiecki et al 2002).

$CI_{50}$  de  $0,024 \mu\text{g/mL}$  foi encontrada para *L. donovani* em ensaio *in vitro*, na avaliação para anfotericina B (Petit et al 1999). Este valor foi próximo ao encontrado para *L. chagasi* -  $0,04 \mu\text{g/mL}$  (3 dias), no presente estudo.

Cepas de *L. braziliensis* apresentaram  $CI_{50}$  que variaram entre  $38,0 \mu\text{M}$  a  $12,0 \mu\text{M}$  para o sulfato de paromomicina (Neal et al 1995).

Sinergismo evidente foi determinado entre paromomicina e Glucantime para *L. braziliensis* e paromomicina e anfotericina B para *L. chagasi*. Esses fármacos apresentam mecanismos de ação diferentes. A paromomicina promove modificações na síntese de RNA e em lipídios polares da membrana, promovendo alterações na sua fluidez (Maafouf et al 1997), já os antimoniais pentavalentes agem inibindo a glicólise com a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, levando a depleção dos níveis de ATP intracelulares. A anfotericina B se liga ao ergosterol, promovendo alterações na permeabilidade da membrana e do equilíbrio osmótico do parasito.

Os resultados de associações indiferentes [*L. braziliensis* - paromomicina + azitromicina ( $CI_{50/90}$ ), paromomicina + miltefosina ( $CI_{50/90}$ ), e *L. chagasi* paromomicina + glucantime ( $CI_{50/90}$ ), e paromomicina + azitromicina ( $CI_{90}$ )] foram obtidos quando houve aumento nos valores da  $CI_{50}$  ou  $CI_{90}$  em um dos fármacos e diminuição no outro fármaco associado (Tabelas 4 e 5).

O sinergismo considerado entre as associações de paromomicina e miltefosina para *L. chagasi* considerou apenas os valores obtidos para as  $CI_{90}$  uma vez que não foi possível determinar a  $CI_{50}$ . A concentração topo determinada para a miltefosina foi de  $22,4 \mu\text{g/mL}$ . Apesar do ensaio de toxicidade para macrófagos



empregando o Alamar Blue™ determinar DE<sub>50</sub> tóxica de 37,8 µg/mL (Tabela 2), a concentração de 22,4 µg/mL e sua subsequente na diluição seriada, 10,2 µg/mL, já foram tóxicas para os macrófagos, que se apresentaram fragmentados.

Para ambos os ensaios com *L. braziliensis* e *L. chagasi* nem sempre houve uma constância na natureza das interações entre as CI<sub>50</sub> e CI<sub>90</sub>. Para as duas espécies o sinergismo foi mais acentuado nas CI<sub>50</sub>. Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação contra o parasito pode depender das suas concentrações. Situação inversa foi observada na avaliação da associação entre fármacos para *L. donovani* e *Plasmodium falciparum*, onde a natureza das interações foi classificada em indiferente (CI<sub>50</sub>) a sinérgico (CI<sub>90</sub>) (Seifert & Croft 2006) e indiferente (CI<sub>50</sub>) a sinérgico (CI<sub>90/99</sub>) (Gupta et al 2002).

Não ocorreram discrepâncias entre as diferentes associações da paromomicina e demais fármacos para *L. braziliensis* e *L. chagasi* (Tabelas 6 e 7). No entanto, deve-se considerar que as espécies de *Leishmania* apresentam características bioquímicas e moleculares próprias e essas podem refletir na variação de sensibilidade entre as espécies aos fármacos.

Os resultados experimentais *in vitro* de associação de fármacos leishmanicidas são bastante limitados. Seifert & Croft (2006) obtiveram resultado próximo de sinérgico para a interação miltefosina e estibogluconato de sódio e indiferença entre miltefosina e os fármacos anfotericina B, sitamaquina e paromomicina. Em outro estudo, a associação miltefosina e anfotericina B também foi considerada indiferente (Mínez et al 2006). Ambos os estudos citados acima foram realizados para *L. donovani*.

As associações *in vitro* avaliadas entre fármacos neste trabalho sugerem sinergismo ou indiferença nas interações. Entretanto, elas não determinam necessariamente a eficácia das combinações no hospedeiro uma vez que também dependem das características farmacocinéticas. Seifert & Croft (2006), por exemplo, não obtiveram sinergismo *in vitro* para a associação miltefosina - paromomicina e miltefosina - anfotericina B; porém os ensaios *in vivo* indicaram altos índices de atividade para essas associações.

Assim, ensaios *in vivo* de associações de fármacos leishmanicidas para estas espécies devem ser conduzidos antes dos ensaios clínicos para melhor avaliação do potencial de sinergismo, evitando assim associações inadequadas e assegurando maior tranquilidade para pacientes e profissionais da saúde.

## 6 Conclusões

- O antimônio pentavalente sintetizado por Farmanguinhos-Fiocruz apresentou atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* para *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*, semelhante à do fármaco referência Glucantime®-Aventis;
- A miltefosina apresentou atividade *in vitro* para *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, em concentrações maiores do que as ativas contra *L. donovani* e não tóxicas para as células do hospedeiro;
- *L. chagasi* e *L. braziliensis* variaram na natureza da resposta à associação entre paromomicina e os fármacos antimônio de meglumina Glucantime, miltefosina, anfotericina B e azitromicina. Foram obtidas associações sinérgicas e indiferentes entre essas interações.

## 7 Anexos

7.1 Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) determinadas para cada proporção – diluição empregadas nos ensaios de associação de amastigotas intracelulares entre a paromomicina e outros fármacos sobre *L. braziliensis*.

### 1- Paromomicina (PA) + Glucantime (Glu)

5 : 0 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	1150,4 $\mu\text{g/mL}$	575,2	287,6	143,8	71,9	35,9	17,9

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 143,8\mu\text{g/mL}$$

4 : 1 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(4) 920,3 $\mu\text{g/mL}$	460,2	230,1	115,0	57,5	28,8	14,4
	(1) 34,7 $\mu\text{g/mL}$	17,3	8,7	4,3	2,2	1,1	0,5

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 143,8\mu\text{g/mL} / \text{IC}_{50} - \text{Glu} = 21,7\mu\text{g/mL}$$

3 : 2 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(3) 690,0 $\mu\text{g/mL}$	345,0	172,5	86,2	43,1	21,6	10,8
	(2) 69,4 $\mu\text{g/mL}$	37,4	17,3	8,7	4,3	2,2	1,1

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 143,8\mu\text{g/mL} // \text{IC}_{50} - \text{Glu} = 21,7\mu\text{g/mL}$$

2 : 3 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(2) 460 $\mu\text{g/mL}$	230	115	57,5	28,7	14,4	7,2
	(3) 104,1 $\mu\text{g/mL}$	52,05	26,0	13,0	6,5	3,2	1,6

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 143,8\mu\text{g/mL} // \text{IC}_{50} - \text{Glu} = 21,7\mu\text{g/mL}$$

1 : 4 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(1) 230 $\mu\text{g/mL}$	115,0	57,5	28,7	14,4	7,2	3,6
	(4) 138,8 $\mu\text{g/mL}$	69,4	34,7	17,3	8,7	4,3	2,2

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 143,8\mu\text{g/mL} // \text{IC}_{50} - \text{Glu} = 21,7\mu\text{g/mL}$$

0 : 5 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	173,6 $\mu\text{g/mL}$	86,8	43,4	21,7	10,9	5,4	2,7

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 21,7\mu\text{g/mL}$$

## 2- Paromomicina (PA) + Miltefosina (Milt)

5 : 0 PA : Milt	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
		1150,4µg/mL	575,2	287,6	143,8	71,9	35,9

$$IC_{50} - PA = 143,8\mu\text{g/mL}$$

4 : 1 PA : Milt	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(4) 920,3µg/mL	460,2	230,1	115,0	57,5	28,8	14,4
	(1) 0,54µg/mL	0,27	0,14	0,068	0,03	0,017	0,008

$$IC_{50} - PA = 143,8\mu\text{g/mL} / IC_{50} - \text{Milt} = 0,34\mu\text{g/mL}$$

3 : 2 PA : Milt	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(3) 690,0µg/mL	345,0	172,5	86,2	43,1	21,6	10,8
	(2) 1,08µg/mL	0,54	0,27	0,14	0,068	0,03	0,017

$$IC_{50} - PA = 143,8\mu\text{g/mL} // IC_{50} - \text{Milt} = 0,34\mu\text{g/mL}$$

2 : 3 PA : Milt	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(2) 460µg/mL	230	115	57,5	28,7	14,4	7,2
	(3) 1,62µg/mL	0,81	0,41	0,20	0,10	0,05	0,025

$$IC_{50} - PA = 143,8\mu\text{g/mL} // IC_{50} - \text{Milt} = 0,34\mu\text{g/mL}$$

1 : 4 PA : Milt	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(1) 230µg/mL	115,0	57,5	28,7	14,4	7,2	3,6
	(4) 2,16µg/mL	1,08	0,54	0,27	0,14	0,068	0,03

$$IC_{50} - PA = 143,8\mu\text{g/mL} // IC_{50} - \text{Milt} = 0,34\mu\text{g/mL}$$

5 : 0 PA : Milt	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
		2,72µg/mL	1,35	0,68	0,34	0,17	0,09

$$IC_{50} - \text{Milt} = 0,34\mu\text{g/mL}$$

## 3- Paromomicina (PA) + Anfotericina B (Anf B)

5 : 0 PA : AnfB	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
		1696,0µg/mL	848,0	424,0	212,0	106,0	53,0

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL}$$

4 : 1 PA : AnfB	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(4) 1356,8µg/mL	678,4	339,2	169,6	84,8	42,4	21,2
	(1) 0,064µg/mL	0,032	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL} / IC_{50} - \text{AnfB} = 0,04\mu\text{g/mL}$$

3 : 2 PA : AnfB	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(3) 690,0µg/mL	1017,6	508,8	254,4	127,2	63,6	31,8
	(2) 0,128µg/mL	0,064	0,032	0,016	0,008	0,004	0,002

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL} / IC_{50} - \text{AnfB} = 0,04\mu\text{g/mL}$$

<b>2 : 3</b> <b>PA :</b> <b>AnfB</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(2) 678,4µg/mL	339,2	169,6	84,8	42,4	21,2	10,6
	(3)0,192µg/mL	0,096	0,048	0,024	0,012	0,006	0,003

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL} / IC_{50} - AnfB = 0,04\mu\text{g/mL}$$

<b>1 : 4</b> <b>PA :</b> <b>AnfB</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(1) 339,2µg/mL	169,6	84,8	42,4	21,2	10,6	5,3
	(4)0,256µg/mL	0,128	0,064	0,032	0,016	0,008	0,004

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL} / IC_{50} - AnfB = 0,04\mu\text{g/mL}$$

<b>5 : 0</b> <b>PA:</b> <b>AnfB</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	0,32µg/mL	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005

$$IC_{50} - AnfB = 0,04\mu\text{g/mL}$$

#### 4- Paromomicina (PA) + Azitromicina (Azi)

<b>5 : 0</b> <b>PA: Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	1696,0µg/mL	848,0	424,0	212,0	106,0	53,0	26,5

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL}$$

<b>4 : 1</b> <b>PA :</b> <b>Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(4) 1356,8µg/mL	678,4	339,2	169,6	84,8	42,4	21,2
	(1) 6,8µg/mL	3,4	1,7	0,85	0,43	0,21	0,11

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL} / IC_{50} - Azi. = 4,25\mu\text{g/mL}$$

<b>3 : 2</b> <b>PA :</b> <b>Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(3) 690,0µg/mL	1017,6	508,8	254,4	127,2	63,6	31,8
	(2) 13,68µg/mL	6,8	3,4	1,7	0,85	0,43	0,21

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL} / IC_{50} - Azi. = 4,25\mu\text{g/mL}$$

<b>2 : 3</b> <b>PA :</b> <b>Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(2) 678,4µg/mL	339,2	169,6	84,8	42,4	21,2	10,6
	(3)20,4µg/mL	10,2	5,1	2,55	1,28	0,64	0,32

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL} / IC_{50} - Azi. = 4,25\mu\text{g/mL}$$

<b>1 : 4</b> <b>PA :</b> <b>Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(1) 339,2µg/mL	169,6	84,8	42,4	21,2	10,6	5,3
	(4)27,2µg/mL	13,6	6,8	3,4	1,7	0,85	0,43

$$IC_{50} - PA = 212,0\mu\text{g/mL} / IC_{50} - Azi. = 4,25\mu\text{g/mL}$$

<b>5 : 0</b> <b>Gluc:</b> <b>Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	34,0µg/mL	17,0	8,5	4,25	2,13	1,06	0,53

$$IC_{50} - Azi. = 4,25\mu\text{g/mL}$$

7.2 Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) determinadas para cada proporção – diluição empregadas nos ensaios de associação de amastigotas intracelulares entre a paromomicina e outros fármacos sobre *L. chagasi*

1- Paromomicina (PA) + Glucantime (Glu)

5 : 0 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	316,8 $\mu\text{g/mL}$		158,4	79,2	39,6	19,8	9,9

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 39,6 \mu\text{g/mL}$$

4 : 1 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(4) 253,4 $\mu\text{g/mL}$	126,7	63,4	31,7	15,8	7,9	3,9
	(1) 218,7 $\mu\text{g/mL}$	109,4	54,7	27,3	13,7	6,8	3,4

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 39,6 \mu\text{g/mL} / \text{IC}_{50} - \text{Glu} = 136,7 \mu\text{g/mL}$$

3 : 2 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(3) 190,2 $\mu\text{g/mL}$	95,1	47,6	23,8	11,9	5,9	2,9
	(2) 437,4 $\mu\text{g/mL}$	218,7	109,4	54,7	27,3	13,7	6,8

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 39,6 \mu\text{g/mL} / \text{IC}_{50} - \text{Glu} = 136,7 \mu\text{g/mL}$$

2 : 3 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(2) 126,7 $\mu\text{g/mL}$	63,4	31,7	15,8	7,9	3,9	1,9
	(3) 656,1 $\mu\text{g/mL}$	328,0	164,0	82,0	41,0	20,5	10,3

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 39,6 \mu\text{g/mL} / \text{IC}_{50} - \text{Glu} = 136,7 \mu\text{g/mL}$$

1 : 4 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(1) 63,3 $\mu\text{g/mL}$	31,7	15,8	7,9	3,9	1,9	0,9
	(4) 874,8 $\mu\text{g/mL}$	437,4	218,7	109,4	54,6	27,3	13,7

$$\text{IC}_{50} - \text{PA} = 39,6 \mu\text{g/mL} / \text{IC}_{50} - \text{Glu} = 136,7 \mu\text{g/mL}$$

0 : 5 PA : Glu	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	1093,6 $\mu\text{g/mL}$		546,8	273,4	136,7	68,3	34,2

$$\text{IC}_{50} - \text{Glu} = 136,7 \mu\text{g/mL}$$

## 2- Paromomicina (PA) + Miltefosina (Milt)

<b>5 : 0</b> <b>PA : Milt</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	316,8µg/mL	158,4	79,2	39,6	19,8	9,9	4,95

$$IC_{50} - PA = 39,6 \mu\text{g/mL}$$

<b>4 : 1</b> <b>PA : Milt</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(4) 253,4µg/mL	126,7	63,4	31,7	15,8	7,9	3,9
	(1) 4,5µg/mL	2,3	1,1	0,6	0,3	0,15	0,07

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - \text{Milt} = 2,8\mu\text{g/mL}$$

<b>3 : 2</b> <b>PA : Milt</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(3) 190,2µg/mL	95,1	47,6	23,8	11,9	5,9	2,9
	(2) 9,0µg/mL	4,5	2,3	1,1	0,6	0,3	0,15

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - \text{Milt} = 2,8\mu\text{g/mL}$$

<b>2 : 3</b> <b>PA : Milt</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(2) 126,7µg/mL	63,4	31,7	15,8	7,9	3,9	1,9
	(3) 13,5µg/mL	6,8	3,4	1,7	0,8	0,4	0,2

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - \text{Milt} = 2,8\mu\text{g/mL}$$

<b>1 : 4</b> <b>PA : Milt</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(1) 63,3µg/mL	31,7	15,8	7,9	3,9	1,9	0,9
	(4) 18,0µg/mL	9,0	4,5	2,3	1,1	0,6	0,3

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - \text{Milt} = 2,8\mu\text{g/mL}$$

<b>0 : 5</b> <b>PA : Milt</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	22,5µg/mL	11,3	5,6	2,8	1,4	0,7	0,4

$$IC_{50} - \text{Milt} = 2,8\mu\text{g/mL}$$

## 3- Paromomicina (PA) + Anfotericina B (Anf B)

<b>5 : 0</b> <b>PA : AnfB</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	316,8µg/mL	158,4	79,2	39,6	19,8	9,9	4,95

$$IC_{50} - PA = 39,6 \mu\text{g/mL}$$

<b>4 : 1</b> <b>PA : AnfB</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(4) 253,4µg/mL	126,7	63,4	31,7	15,8	7,9	3,9
	(1) 0,048µg/mL	0,024	0,012	0,006	0,003	0,0015	0,00075

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - \text{AnfB} = 0,03\mu\text{g/mL}$$

<b>3 : 2</b> <b>PA : AnfB</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(3) 190,2µg/mL	95,1	47,6	23,8	11,9	5,9	2,9
	(2) 0,096µg/mL	0,048	0,024	0,012	0,006	0,003	0,0015

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - \text{AnfB} = 0,03\mu\text{g/mL}$$

<b>2 : 3</b> <b>PA :</b> <b>AnfB</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(2) 126,7/ $\mu\text{g/mL}$	63,4	31,7	15,8	7,9	3,9	1,9
	(3) 0,144/ $\mu\text{g/mL}$	0,072	0,036	0,018	0,009	0,0045	0,0023

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - AnfB = 0,03\mu\text{g/mL}$$

<b>1 : 4</b> <b>PA :</b> <b>AnfB</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(1) 63,3/ $\mu\text{g/mL}$	31,7	15,8	7,9	3,9	1,9	0,9
	(4) 0,192/ $\mu\text{g/mL}$	0,096	0,048	0,024	0,012	0,006	0,003

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - AnfB = 0,03\mu\text{g/mL}$$

<b>0 : 5</b> <b>PA: AnfB</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	0,24 $\mu\text{g/mL}$	0,12	0,06	0,03	0,015	0,0075	0,0038

$$IC_{50} - AnfB = 0,03\mu\text{g/mL}$$

#### 4- Paromomicina (PA) + Azitromicina (Azi)

<b>5 : 0</b> <b>PA: Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	316,8/ $\mu\text{g/mL}$	158,4	79,2	39,6	19,8	9,9	4,95

$$IC_{50} - PA = 39,6 \mu\text{g/mL}$$

<b>4 : 1</b> <b>PA : Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(4) 253,4/ $\mu\text{g/mL}$	126,7	63,4	31,7	15,8	7,9	3,9
	(1) 11,68/ $\mu\text{g/mL}$	c	2,92	1,46	0,73	0,37	0,18

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - Azi = 7,3\mu\text{g/mL}$$

<b>3 : 2</b> <b>PA : Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(3) 190,2/ $\mu\text{g/mL}$	95,1	47,6	23,8	11,9	5,9	2,9
	(2) 23,36/ $\mu\text{g/mL}$	11,68	5,84	2,92	1,46	0,73	0,37

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - Azi = 7,3\mu\text{g/mL}$$

<b>2 : 3</b> <b>PA : Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(2) 126,7/ $\mu\text{g/mL}$	63,4	31,7	15,8	7,9	3,9	1,9
	(3) 35,04/ $\mu\text{g/mL}$	17,52	8,76	4,38	2,19	1,09	0,55

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - Azi = 7,3\mu\text{g/mL}$$

<b>1 : 4</b> <b>PA : Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	(1) 63,3/ $\mu\text{g/mL}$	31,7	15,8	7,9	3,9	1,9	0,9
	(4) 46,72/ $\mu\text{g/mL}$	23,36	11,68	5,84	2,92	1,46	0,73

$$IC_{50} - PA = 39,6\mu\text{g/mL} / IC_{50} - Azi = 7,3\mu\text{g/mL}$$

<b>0 : 5</b> <b>PA: Azi</b>	Mastermix	1 <sup>a</sup> diluição	2 <sup>a</sup> diluição	3 <sup>a</sup> diluição	4 <sup>a</sup> diluição	5 <sup>a</sup> diluição	6 <sup>a</sup> diluição
	58,4 $\mu\text{g/mL}$	29,2	14,6	7,3	3,65	1,83	0,91

$$IC_{50} - Azi = 7,3\mu\text{g/mL}$$



## In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*

Eliane de Morais-Teixeira, Alcione S de Carvalho<sup>1</sup>, Jorge CS da Costa<sup>1</sup>, Silvio L Duarte<sup>1</sup>, Jorge S Mendonça<sup>1</sup>, Núbia Boechat<sup>1</sup>, Ana Rabello<sup>1\*</sup>

Laboratório de Pesquisa Clínica, Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil <sup>1</sup>Departamento de Síntese Orgânica, Farmanguinhos-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*The leishmanicidal activity of four batches of meglumine antimoniate, produced in Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil (TAMs), was assessed and compared to Glucantime®-Aventis Pharma Ltda. Using the amastigote-like in vitro model, the active concentrations of Sb<sup>3+</sup> varied from 10 µg/ml to 300 µg/ml for L. (L.) chagasi and from 50 µg/ml to 300 µg/ml for L. (L.) amazonensis, with no statistically significant differences among the four batches of TAMs and Glucantime®. The inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) determined by the amastigote-infected macrophage model for TAM01/03 and Glucantime® were, respectively: 26.3 µg/ml and 127.6 µg/ml for L. chagasi, 15.4 µg/ml and 22.9 µg/ml for L. amazonensis, and 12.1 µg/ml and 24.2 µg/ml for L. (V.) braziliensis. The activities of the four batches of TAMs were confirmed in an in vivo model by assessing, during eight weeks skin lesions caused by L. braziliensis in hamster that were treated with 20mg Sb<sup>3+</sup>/Kg/day for 30 consecutive days. The meglumine antimoniate produced by Farmanguinhos was as effective as the reference drug, Glucantime®-Aventis, against three species of Leishmania that are of medical importance in Brazil.*

Key words: leishmaniasis - treatment - meglumine antimoniate - in vitro - in vivo - drug evaluation

The protozoan parasite *Leishmania* causes a variety of clinical diseases that afflict 12 million people worldwide. Organic salts of pentavalent antimony have been used for the treatment of all clinical forms of leishmaniasis for more than 60 years. Antimonials are thought to act by inhibiting the enzymes of glycolysis and other metabolic pathways (Berman 1988). Two formulations of pentavalent antimonials are currently used: sodium stibogluconate (Pentostam®) and meglumine antimoniate (Glucantime®). Both treatments are given intravenously or intramuscularly and demonstrate similar efficacy when used in equivalent doses.

The Brazilian Ministry of Health recommends a once-daily injection of 20mg Sb<sup>3+</sup>/Kg for 20 to 40 days for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) and 15mg/Kg/day for 20 days for the treatment of cutaneous leishmaniasis (MS 2006a, b). The cost per treatment, including delivery and clinical monitoring, reaches approximately US\$ 200. This is a relatively high expenditure for public health as about 38,000 patients are treated yearly. The cost of Glucantime® is about US\$80, depending on the clinical form and schedule. Cheaper generic formulations of sodium stibogluconate have recently become available. Studies conducted in the Sudan, Kenya, Ethiopia, Bolivia, and Colombia showed that generic sodium stibogluconate (Albert David Ltd, Calcutta, India) was

equivalent to Pentostam® and Glucantime® for the treatment of leishmaniasis in terms of both safety and efficacy (Veeken et al. 2000, Moore et al. 2001, Ritmeijer et al. 2001, Soto et al. 2004, Bermúdez et al. 2006). The reported cost of the generic pentavalent antimony stibogluconate is approximately 7% that of Pentostam® (~ US\$ 13/treatment; Ritmeijer et al. 2001), and 20% that of meglumine antimoniate in the form of Glucantime® (Soto et al. 2004).

In 2002, due to the menace of an unsupplied market of meglumine antimoniate, Farmanguinhos-Fiocruz (TAMs), a pharmaceutical company that belongs to the Brazilian Ministry of Health, developed an alternative process to produce this API (Active Pharmaceutical Ingredient) in its R&D laboratory. This study presents the evaluation of the activity of the TAMs against the *Leishmania* species of medical importance in Brazil, compared to the reference drug, Glucantime®-Aventis Pharma.

### MATERIALS AND METHODS

The leishmanicidal activities of four batches of TAMs were assessed and compared to Glucantime®-Aventis using the amastigote-like in vitro model. Next, the inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of one of the batches of meglumine antimoniate (TAM 01/03-Farmanguinhos) was determined using the amastigote-infected macrophage model. Additionally, an in vivo study was conducted to evaluate the efficacy of the four batches of TAMs against *L. (Viannia) braziliensis*.

*Drugs* - Four batches of TAMs were prepared in the R&D laboratories of Farmanguinhos-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil (batches: TAM 01/03, TAM 02/03, TAM

Financial support: CNPq, Fapemig

\* Corresponding author: ana@cpqrr.fiocruz.br

Received: 18 February 2008

Accepted: 10 June 2008



03/03 and TAM 021/02) according to Gailliot (1941). An alternative one-pot procedure was employed, and synthesis was initiated using N-methylglucamine (USP CAS 6.284-40-8 Spectrum Chemical Mfg. Corp. USA, lot PG 0147) in aqueous diethyl-amine in the presence of antimony pentachloride (Chemical & Metal Industries, Inc. USA). The target compound was then precipitated after addition of sufficient ethanol to the reactor (Barreto et al. 2005). Glucantime®-Aventis Pharma Brazil (300mg/ml, 81mg/ml Sb<sup>v</sup>-batch 300063) and Amphotericin B (AmB) deoxycholate (Fungizone®-Bristol-Meyers Squibb Pharmaceuticals Ltda, Bedford, USA) were used as reference and control drugs, respectively.

For the *in vitro* assays, the four batches of TAMs were suspended in deionized water at 80°C and sterilized by passage through 0.2 µm membrane filters. AmB was reconstituted by rapidly adding 10 ml of water into the lyophilized cake and shaking the vial until the colloidal suspension became clear, as per the manufacturer's instructions. All subsequent dilutions were prepared in fresh RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) culture medium on the day of the assay. Glucantime® and TAMs were stored at room temperature in the dark until use. AmB was maintained at 2-8°C and was used for a maximum of 30 days (manufacturer's instructions).

*Parasites and cultivation of amastigote-like forms* - *Leishmania (Leishmania) chagasi* strain MHOM/BR/70/BH46, *L. (Leishmania) amazonensis* strain IFLA/BR/1967/PH-8, and *L. braziliensis* strain WHO-MHOM/BR/75/M2903 were used throughout the study. The strains were maintained by successive passages in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and amastigotes were harvested from spleen (*L. chagasi*) or skin lesions (*L. amazonensis* and *L. braziliensis*) of infected animals.

Amastigote-like forms were transformed from stationary-phase promastigotes cultivated in Schneider's insect medium (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; GIBCO, Grand Island, USA) at pH 7.2, 26°C. Promastigotes were centrifuged (10 min/1000 g), resuspended in Schneider's medium, and transformed into amastigote-like forms according to Teixeira et al. (2002), with modifications: *L. chagasi*, 35°C, pH 7.2, 10% FCS, for 6 days; *L. amazonensis*, 32°C, pH 6.0, 5% FCS, for 7 days; and *L. braziliensis*, 32°C, pH 6.0, 5% FCS, for 5 days. These parameters yielded the highest transformation rates as assessed by previous comparisons using different culturing conditions for each species (data not shown).

*Amastigote-like model for L. chagasi and L. amazonensis* - The leishmanicidal activities of the four batches of TAMs were tested by using the amastigote-like model. The amastigote-like forms were added to the Schneider's medium in concentrations of 5x10<sup>7</sup>/ml for *L. chagasi*, and 2x10<sup>7</sup>/ml for *L. amazonensis* and incubated with TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03, TAM 021/02 and Glucantime® (concentrations of Sb<sup>v</sup>: 5, 10, 50, 150 and 300 µg/ml) and AmB (0.2 µg/ml). Samples were seeded into 96-well flat-bottom microtrays, in triplicate, and were incubated at 35°C or 32°C. After 72h, parasites were counted using a Neubauer™ chamber. Three independent experiments

were performed in triplicate on different days. The number of parasites counted in wells without drug was set as 100% parasite survival (parasite controls).

*Amastigote-macrophage assay for L. chagasi, L. amazonensis, and L. braziliensis* - Balb/c mice were injected intraperitoneally with 1.5 ml of 3% tioglicolate medium (Biobrás, Brazil). After 96 h, the peritoneal macrophages were harvested by peritoneal lavage using cold RPMI-1640 medium. Cells were counted, centrifuged, and resuspended at a concentration of 4x10<sup>5</sup>/ml in RPMI-1640 medium without supplements. Sterile round glass coverslips (13 mm) were placed in each well of 24-well culture plates. Macrophages were pipetted in a volume of 500 µl/well and allowed to attach to the coverslips for 2 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After 2 h, the medium was removed from the wells and replaced with 500 µl of warm (37°C) RPMI containing 10% FCS and penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml). The following day, a suspension of 4x10<sup>6</sup> amastigote-like *L. chagasi*, *L. amazonensis*, or *L. braziliensis* was added to each well in 500 µl of RPMI (macrophage:parasite ratio of 1:10). The plates were incubated for 4 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, and the medium was aspirated to remove free-floating parasites. Fresh RPMI (1 ml) with or without the drugs TAM 01/03, Glucantime®, or AmB (0.2 µg/ml) at the appropriate concentration of Sb<sup>v</sup> (250 µg to 7.8 µg for *L. chagasi* and 40 µg to 1.2 µg for *L. amazonensis* and *L. braziliensis*) was added to wells in triplicate. The plates were incubated for 72 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The medium was aspirated and the coverslips were removed, air-dried, and glued to microscope slides. After staining with Giemsa, the cells were counted. The assays were considered valid if at least 80% of the macrophages in the control wells were infected. Three independent experiments in triplicate were performed for each concentration to determine the meglumine antimoniate efficacy. The results are presented as the ratio of infected (number of amastigotes) proportions between treated and non-treated macrophage cultures.

*In vivo evaluation: golden hamster model for L. braziliensis* - WHO-MHOM/BR/75/M2903 *L. braziliensis* was isolated from fragments of cutaneous lesions present in the paws of previously infected hamsters. The fragments were excised, macerated in saline solution, and quantified in a Neubauer™ chamber. Fifty-four male hamsters, weighing 100 to 110 g, were infected with *L. braziliensis* amastigotes (8x10<sup>7</sup>/100 µl) by subcutaneous injection in the hind footpad. Treatment by intramuscular injection of each formulation of TAMs (20 mg Sb<sup>v</sup>/kg/day) was initiated five days after infection and was given over the course of 30 consecutive days as follows: TAM 01/03 (group B), TAM 02/03 (group C), TAM 03/03 (group D), TAM 021/02 (group E), Glucantime® (drug-reference group F). Group A is the untreated control group, which received intramuscular injections of distilled sterile water. The lesions were examined weekly for eight weeks by measuring the size of the infected footpad with a vernier caliper. The animals were euthanized 30 days after the end of the treatment.



**Data analysis** - The data were processed using MINITAB V. 13.1 or Graph Prism 4 software. The active drug concentrations were compared by analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis tests, depending on the distribution of the variables and paired comparisons done by the Dunn's or Tukey tests.  $IC_{50}$  values were calculated by linear regression analysis (MINITAB V. 13.1) or linear interpolation (Microsoft Office Excel 2003) (Huber & Koella 1993). Linear regression was used when the distribution was normal (parametric method) and linear interpolation (non-parametric) was applied when the distribution was not normal.

**Ethics** - Animals were handled according to local and federal regulations, and the research protocols were approved by the Fiocruz Committee on Animal Research (protocol P-0321/06; licence L-0024/8).

### RESULTS

**Activity of the four batches of TAMs using the amastigote-like model** - The leishmanicidal activities against amastigote-like forms of *L. chagasi* and *L. amazonensis* of the four batches of TAMs, as well as meglumine antimoniate, Glucantime®-Aventis, AmB, and the control, are shown in Fig. 1. Activity was detected for concentrations that varied from 10 µg/ml to 300 µg/ml for *L. chagasi* (Fig. 1A) and from 50 µg/ml to 300 µg/ml for *L. amazonensis* (Fig. 1B). No statistically significant differences were observed among the four batches of TAMs at any concentration. The mean value of parasite inhibition observed with the control drug (0.2 µg/ml AmB) was 94.6% for *L. chagasi* and 80% for *L. amazonensis*.

**Activity of TAMs using the amastigote-infected macrophage model** - Peritoneal macrophages infected with amastigote-like forms of *L. chagasi*, *L. amazonensis*, and *L. braziliensis* were treated with different concentrations of Glucantime® and one batch of TAMs: TAM 01/03. The Table summarizes the comparative inhibitory concentrations.

In the amastigote intracellular assay of *L. chagasi*, the  $IC_{50}$  was 26.3 µg/ml for TAM 01/03 and 127.6 µg/ml

(CI = 106.7-148.9 µg/ml) for Glucantime®, respectively, as determined by linear interpolation and linear regression ( $r^2 = 75.8\%$ ). These  $IC_{50}$  values were statistically different ( $p = 0.0000$ ), with the  $IC_{50}$  of TAM 01/03 lower than that observed for Glucantime®. The  $IC_{50}$  values of 15.4 µg/ml (CI = 10.1-20.7 µg/ml) for TAM 01/03 and 22.9 µg/ml (CI = 18.2-27.5 µg/ml) for Glucantime® for the activity against intracellular amastigotes of *L. amazonensis*, were determined by linear regression ( $r^2 = 67.0\%$  and  $83.7\%$ ). No statistical difference was observed between these  $IC_{50}$  values ( $p = 0.092$ ). The  $IC_{50}$  values for *L. braziliensis* were 12.1 µg/ml (CI = 8.6-15.6 µg/ml) for TAM 01/03 and 24.2 µg/ml (CI = 21.1-27.4 µg/ml) for Glucantime®, both of which were estimated by linear regression ( $r^2 = 85.3\%$  and  $92.9\%$ ). These values were statistically different ( $p = 0.021$ ), with the lower  $IC_{50}$  value for TAM 01/03.

Comparison of the  $IC_{50}$  of Glucantime®-Aventis among *Leishmania* species showed statistical differences between *L. chagasi* and *L. amazonensis* ( $p < 0.01$ ), and *L. chagasi* and *L. braziliensis* ( $p < 0.01$ ). The values were not statistically different ( $p > 0.05$ ) between *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. In contrast, the  $IC_{50}$  of TAM 01/03 were similar ( $p = 0.368$ ) among the studied species. The mean value of parasite inhibition observed with the control drug (0.2 µg/ml AmB) was 99.7% for *L. chagasi*, 99.5% for *L. amazonensis*, and 98% for *L. braziliensis*.

**In vivo activity of TAMs and Glucantime®-Aventis against *L. braziliensis*** - Hamsters were infected with an amastigote suspension of *L. braziliensis* and treated with 20 mg Sb<sup>v</sup>/Kg/day of the four batches of TAMs or Glucantime® beginning at five days post-infection and continued for 30 consecutive days. The progress of the lesions was assessed weekly for eight weeks (Fig. 2). Nodes were observed in the footpads of the animals five days after infection (before treatment), and no statistically significant difference was observed among the node size of the groups ( $p = 0.854$ ). After seven days of treatment, skin lesions remained similar among the groups ( $p = 0.056$ ). Fourteen days after treatment initiation,

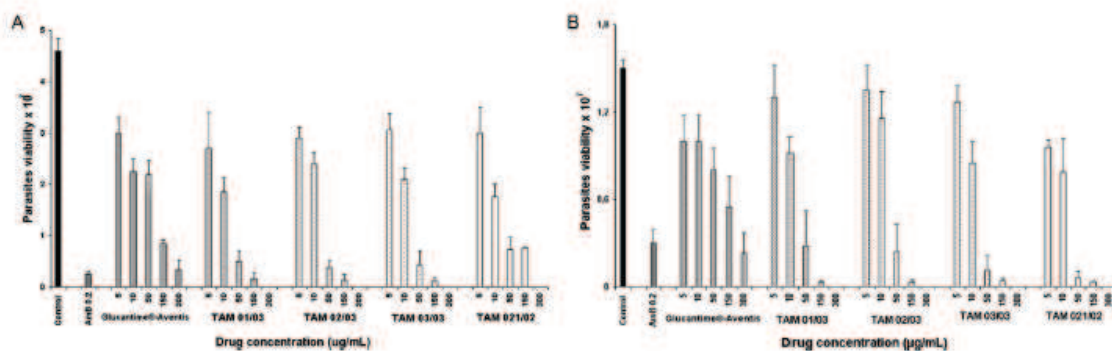


Fig. 1: activity of meglumine antimoniate Glucantime®-Aventis and the four batches from Farmanguinhos (TAM 01/03, TAM 02/03, TAM 03/03 and TAM 021/02) against amastigote-like forms of *L. chagasi* (A) and *L. amazonensis* (B). Amphotericin B (AmB) was used as the reference control drug. Values represent the mean  $\pm$  SD of three repeated experiments, each performed in triplicate. Significant differences for *L. chagasi* were observed at 10 µg/ml: control versus Gluc® and TAMs ( $p < 0.05$ ); 50 µg/ml and 150 µg/ml: control versus Gluc®, Gluc® and TAMs ( $p < 0.01$ ); 300 µg/ml: control x Gluc® ( $p < 0.01$ ). For *L. amazonensis*, 50 µg/ml: control versus Gluc® and TAMs ( $p < 0.05$ ); 150 µg/ml: control versus Gluc® and TAMs ( $p < 0.01$ ); 300 µg/ml: control versus Gluc® ( $p < 0.01$ ).



TABLE  
Inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of Glucantime and meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz TAM 01/03 against intracellular amastigote of three *Leishmania* species

Parasite	IC <sub>50</sub> - µg/ml (CI) <sup>a</sup>		p value
	Glucantime® - Aventis	TAM 01/03	
<i>L. (L.) chagasi</i>	127.6 (106.2 - 148.9)	26.3 <sup>b</sup>	0.000
<i>L. (L.) amazonensis</i>	22.9 (18.2 - 27.5)	15.4 (10.1 - 20.7)	0.092
<i>L. (V.) braziliensis</i>	24.2 (21.1 - 27.4)	12.1 (8.6 - 15.6)	0.021

a: confidence interval; b: IC<sub>50</sub> determined by linear interpolation.

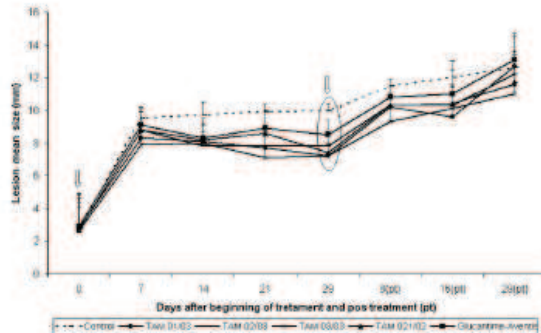


Fig. 2: evaluation of the activity of meglumine antimoniate in male golden hamsters infected with *L. braziliensis*. Animals were treated vial intramuscular with 20mg Sb<sup>5+</sup>/Kg/day of meglumine antimoniate (Glucantime®-Aventis and TAMs-Farmanguinhos) for 30 days. Vertical bars represent the average and standard error of lesion size (diameter) for each group. The arrows indicate the start and end of treatment. The ellipse indicates the maximum activity between the treatment-groups and the control. No statistical differences were observed between the four batches of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos and the reference drug Glucantime®.

however, the lesions became thicker in the group of untreated hamsters compared with the group that received TAM 02/03 ( $p < 0.01$ ) or TAM 03/03 ( $p < 0.05$ ). No statistical differences were observed among the four batches of TAMs or between each TAM and Glucantime®. This trend persisted for 29 days after the beginning of treatment, when the lesions were significantly larger in the untreated group compared to all treated-groups (TAM 01/03,  $p = 0.0000$ ; TAM 02/03,  $p = 0.0002$ ; TAM 03/03,  $p = 0.0000$ ; TAM 021/02,  $p = 0.0000$ ; Glucantime®,  $p = 0.0298$ ). The lesions of all groups worsened after treatment end. Statistical differences were still significant between the untreated group and TAM 01/03 and TAM 03/03 at eight and 16 days after treatment ended ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.0036$  and  $p = 0.0357$ ;  $p = 0.0357$ , respectively). At 29 days after the end of treatment, lesions had increased in all groups, but the differences among groups were not significant ( $p = 0.157$ ).

#### DISCUSSION

Despite their toxicity, pentavalent antimonials (Sb<sup>5+</sup>) in the form of sodium stibogluconate (Pentostam®) and meglumine antimoniate (Glucantime®) remain the drugs of choice for the treatment of leishmaniasis in

many countries, mainly due to their effectiveness and relatively low cost compared with the therapeutic alternatives currently available.

In this work, the *in vitro* and *in vivo* activity of the TAMs was assessed and compared to the reference drug Glucantime®-Aventis. Due to the simplicity of the amastigote-like assay and the avoidance of animals use, this model was chosen for the initial testing and screening. As this model showed that the four batches have similar *in vitro* activity, only one of the batches (TAM 01/03) was tested in the macrophage assay to determine the IC<sub>50</sub>. Moreover, for the three species tested, the IC<sub>50</sub> remained below the dose that was toxic for macrophages, which was determined to be higher than 300 µg/ml for each of the four batches (data not shown).

Alternative generic drugs for the treatment of neglected diseases are tactical for the disease control programs. The price and sustainability of drug production are key points that may hinder control strategies or, even worse, risk the lives of patients. Nevertheless, the quality of the drug production needs to be carefully assessed. It is important to note that the activity obtained with the four batches of the TAMs was reproducible, as inter-batch variation is one important shortcoming associated with antimoniate production.

The threat of antimoniate to the lives of patients has been experienced in different countries. In 2000, the Brazilian Ministry of Health received notification from public health care centers of the high frequency of side effects reported by patients receiving meglumine antimoniate produced by Eurofarma (registered as similar to the reference product at the National Regulatory Agency - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA). The epidemiological and the clinical investigation led to physical chemistry analysis of the batches, which resulted in the detection of heavy metals (Silva Junior 2001). The higher frequency of skin reactions in patients was attributed to the presence of heavy metals (Romero et al. 2003).

In Nepal, fatal cardiotoxicity occurred among VL patients treated with a batch of generic sodium stibogluconate from GL Pharmaceuticals, Calcutta, India. These instances are in contrast with the low total death rate and the low death rate due to cardiotoxicity observed among patients treated with generic sodium stibogluconate from Albert David Ltd (Rijal et al. 2003).

Our *in vitro* and *in vivo* results showed that the TAMs was as active as the reference drug Glucantime®-Aventis against species of *Leishmania* of medical importance in



Brazil. Further steps are required to complete the generic drug development. The most challenging issue is to achieve a stable formulation as described by Cabral et al. (2008), which developed formulations of meglumine antimoniate with higher stability regarding the increase in Sb<sup>III</sup> percentage. Quality control of produced batches, chemical analysis, and bioequivalence studies would then suffice to recommend the adoption of the generic product as a low cost alternative to the branded reference drug. A clinical study addressing efficacy and safety would complement the current study.

#### REFERENCES

- Barreto Jr AC, Estevão LRM, Biscaia Jr EC, de Carvalho AS, Duarte SL, Costa JCS, Souza MVN, de Mendonça JS, da Silva JFC 2005. Evaluating the effect of the antimonium pentachloride feed rate to ensure safer conditions during the synthesis of meglumine antimoniate. *Ind Eng Chem Res* 44: 6578-6582.
- Berman JD 1988. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis* 10: 560-586.
- Bermúdez H, Rojas E, García L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M, Chappuis F 2006. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Am Trop Med Parasitol* 100: 591-600.
- Cabral LM, Juliano VNM, Dias LRS, Dornelas CB, Rodrigues CR, Villardi M, Castro HC, Santos TC 2008. Speciation of antimony (III) and antimony (V) using hybrite generation for meglumine antimoniate pharmaceutical formulations quality control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 130-137.
- Gailliot PL 1941. Process for the manufacture of new organic antimony compounds. (Société des usines chimiques de Rhone-Poulenc). *GB Patent* 533-354.
- Huber W, Koella JC 1993. A comparison of three methods of estimating EC<sub>50</sub> in studies of drug resistance of malaria parasites. *Acta Trop* 55: 257-261.
- Moore E, O'Flaherty D, Heuvelmans H, Seaman J, Veeken H, de Wit S, Davidson R 2001. Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Bull World Health Organ* 79: 388-393.
- MS - Ministério da Saúde 2006a. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial*. Secretaria de Vigilância e Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, Editora MS, 136 pp.
- MS - Ministério da Saúde 2006b. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*, Secretaria de Vigilância e Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, Editora MS, 120 pp.
- Rijal S, Chappuis F, Singh R, Boelaert M, Loutan L, Koirala S 2003. Sodium stibogluconate cardiotoxicity and safety of generics. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 597-598.
- Ritmeijer K, Veeken H, Melaku Y, Leal G, Amsalu R, Seaman J, Davidson RN 2001. Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent. HIV co-infected patients have a poor outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 668-672.
- Romero GAS, Flores EMM, Noronha EF, Macedo VO 2003. High frequency of skin reactions in patients with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate contaminated with heavy metals. A comparative approach using historical controls. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 145-149.
- Silva Junior JB 2001. Antimoniato de meglumina. Relatório técnico. Brasília: CENEPI/FUNASA 2000. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 103-105.
- Soto J, Valda-Rodriguez L, Toledo J, Vera-Navarro L, Luz M, Monasterios-Torrico H, Veja J, Berman J 2004. Comparison of generic branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 71: 577-581.
- Teixeira MCA, Santos RJ, Sampaio RB, Pontes-de-Carvalho L, dos Santos WLC 2002. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol Res* 88: 963-968.
- Veeken H, Ritmeijer K, Seaman J, Davidson R 2000. A randomized comparison of branded sodium stibogluconate and generic sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis under field conditions in Sudan. *Trop Med Int Health* 5: 312-317.

## 8 Referências Bibliográficas

Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB et al. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. N. Engl. J. Med. 2002;346:891-895.

Alves LV, Temporal RM, Cysne-Finkelstein L, Leon LL. Efficacy of a Diarylheptanoid derivative against *Leishmania amazonensis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003;98(4):553-555.

Arana BA, Mendonza CE, Rizzo NR, Kroeger A. Randomized, controlled, double blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methybenzethonium chloride ointment in Guatemala. Am.J. Trop. Med. Hyg. 2001; 65:466-470.

Arthur G & Bittman R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. Biochem. Biophys. Acta. 1998;1390:85-102.

Atkinson A, Bennett J. Amphotericin B pharmacokinetic in humans. Antimicrob. Agents Chomother. 1978;13(2):274-276.

Bacharach V, Brem S, Werman SB, Slnur If, El-On J, Greenblatt Cl. *Leishmania* spp: effect of inhibitors on growth and on polyamine and macromoleculas synthesis. Exp. Parasitol. 1979;48:464-470.

Bafica A, Oliveira F, Freitas LAR, Nascimento EG, Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifyline. Int. J. Dermatol. 2003;42:203-207.

Banduwardene R, Mullen AB, Carter KC. Immune response of *Leishmania donovani* infected Balb/c mice following treatment with free and vesicular sodium stibogluconate formulations. Int. J. Immunopharmacol. 1997;19:195-203.

Bangs JD, Ransom DA, Nimick M, Christie GH, Hooper NM. *In vitro* cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001;25(11):111-117.

Basselin M, Badet-Denisot MA, Lawrence F, Robert-Gero M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild – type pentamidine treated and pentamidine – resistant *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 1997;85:274-282.

Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MP. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(12):3731-3738.

Beckers CJ, Roos DS, Donald RG, Luft BJ, Schwab JC, Cao Y, Joiner KA. Inhibition of cytoplasmic and organelles protein synthesis in *Toxoplasma gondii*: implications for the target of macrolide antibiotics. *J. Clin. Invest.* 1995;95:367-376.

Bennett NM. Amphotericin B. In: Kucers A, Bennett NM. *The use of antibiotics*. 4<sup>th</sup> ed Philadelphia: JB Lippincott, 1987;1441-1477.

Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev. Infect. Dis.* 1988;10:560-586.

Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidson R, Kuzoe F, Pang L, Weerasuriya K, Bryceson AD. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ.* 1998;76(1):25-32.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the leishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1985; 27:916-920.

Berman JD, Bryceson ADM, Croft SL, Engel J, Crutteridge W, Karbwang J, Sindermann H, Soto J, Sundar S, Urbine JA. Miltefosine: issues to be addressed in the future. 2006. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006;100:541-544.

Bermúdez H, Rojas E, Garcia L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M and Chappuis F. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolívia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2006;100(7): 591-600.

Blais J, Bcauchamp D, Chamberland S. Azithromycin uptake and intracellular accumulation by *Toxoplasma gondii* infected macrophages. *J. Antimicrob. Chemother.* 1994;34:371-382.

Blum J, Desjeux P, Schuwatz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004;53(2):158-166.

Brajtburg J & Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin Microbiol. Reviews* 1996;9(4):512-531.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 2006a. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. Brasília: Editora MS, 136 pp.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 2006b. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Editora MS, 120 pp.

Bryceson ADM, Murphy A, Moody AH. Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis with aminosidine ointment: Results of an open study in London. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994;88:226-228.

Bryceson ADM. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop. Med. Int. Health* 2001;6:928-934.

Cabral LM, Juliano VNM, Dias LRS, Dornelas CB, Rodrigues CR, Villardi M, Castro HC, Santos TC. Speciation of antimony (III) and antimony (V) using hybrid generation for meglumine antimoniate pharmaceutical formulations quality control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2008;103:130-137.



Chakraborty AK & Majunder HK. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. Bich. Biophys. Res. Commun. 1988; 152:605-612.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ahalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature Reviews;Microbiol. 2007;5:57-516.

Chunge CN, Owate J, Pamba HO, Donno L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 1990.

Carvalho, Silvio Fernando Guimarães de. Utilização de baixas doses de desoxicolato de anfotericina b no tratamento da leishmaniose visceral em crianças e adolescentes [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina; 2000. Disponível em: <http://servicos.capes.gov.br/capesdw/resumo.html?idtese=200011732001010035P9> Acesso em 27 dez. 2008.

Carvalho, Silvio Fernando Guimarães de. Associação de antimonial pentavalente e desoxicolato de anfotericina B no tratamento da Leishmaniose Visceral em crianças e adolescentes [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina; 2005. Disponível em: <http://servicos.capes.gov.br/capesdw/resumo.html?idtese=200525232001010035P9> Acesso em 27 dez. 2008.

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 (L.) amazonensis*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008;41(4):424-427.

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. Biochem. Pharmacol. 1987;36:2633-2636.

Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med. Int. Health.* 2001; 6(11):899-905.

Croft SL & Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr. Pharma Dis.* 2002;8:319-342.

Croft SL & Coombs GH. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends. Parasitol.* 2003;19(11):502-508.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drugs resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol Reviews.* 2006;19(1):111-126.

Debrabant A, Joshi MB, Pimenta PFP, Dennis M. Genertion of *Leishmania donovani* axenic amastigote: their growth and biological characteristics. *Int. J. Parasitol.* 2004;34(2):205-217.

Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, Sanchy J, Schster B, Grogl M. Phase 2 trial of WR 6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001;65(6):685-689.

Desjeux P. Global control and *Leishmania* HIV co-infection. *Clin. Dermatol.* 1999;17:317-325.

Desjeux P. Leishmaniasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2:692.

Dey T, Afrin F, Anam K, Ali N. Infectivity and virulence of *Leishmania donovani* promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. *J. Eukaryot Microbiol.* 2002;49:270-274.

Donovlick R, Gold W, Pagano JF, Stout HA. Amphotericin A and B, antifungal antibiotic produced by a streptomycete: I in vitro studies. *Antibiot. Ann.* 1955-1956;3:579-586.

Dumas JL, Chang R, Mermillod B, Piguet PF, Comte R, Pechere JC. Evaluation of the efficacy of prolonged administration of azithromycin in a murine model of chronic toxoplasmosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1994;34:111-118.

El-On J & Hamburger AD. Topical treatment of New and Old World cutaneous leishmaniasis in experimental animals. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1987;81:734-737.

El-On J, Livshin R, Even-Paz Z, Hamburger D, Weinrauch I. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.* 1986;87:284-288.

El-On J & Messer G. *Leishmania major*: antileishmanial activity of methylbenthonium choride. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1986;35:1110-1116.

Ephros M, Waldman E & Zilberstein D. Pentostan induces resistencia to antimony and the preservative clorocresol in *Leishmania donovai* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemothr.* 1997;41(5):1064-1068.

Esfandiarpour I & Alavi A. Evaluating the efficacy of allopurinol and meglumina antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Pharmacol. Ther.* 2002;41:521-524.

Epstein ME, Amodio-Groton M, Sadick NS. Antimicrobiol agents for the dermatologist. II. Macrolides, fluorquinelones, rifamycin, tetracyclines, trimethoprim – sulfamethoxazole, and clindamycin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1997;37(3PE1):365-381.quiz 382-384.

Escobar P, Yarley V, Croft SL. Activities of hexadecylphosphocholine (Miltefosine), Ambisome, and Sodium Stibogluconate (Pentostan) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Ant. Agents Chemother.* 2001;45(6):1872-1875.

Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL. Sensitivities of *Leishmania* species to hesadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.* 2002;81:151-157.

Esfandiarpour I & Alavi A. Evaluating the efficacy of allopurinol and meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Pharmacol. Ther.* 2002;41:521-524.

Eue LRZ & Arndt D. Alkylphosphocholine – induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by V937 cells. *J. Cancer Res. Oncol.* 1995;121:350-356.

Ferreira LS, Souza RCC, Tavares C. A. P, Nunan EA ; Fernandes APSM, Ferreira, LAM. Desenvolvimento de formulações contendo paromomicina para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea. *Rev. Soc. Bras. Med.Trop.* 2002;35:S113-S117

Fischer C, Voss A, Engel J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.* 2001;190:85-87.

Frezárd F, Michalick MS, Soares CF, Demichele C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2000;33(7):841-846.

Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJF, Derovin F. Efficacy of aminosidine administered alone or in combination with meglumine antimoniate for the treatment of experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1997;40:287-289.

Gangneux JP, Dullin M, Sulahian A, Garin YJF, Derouin F. Experimental evaluation of second – line oral treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999;43(1):172-174.

Gasser JRRA, Magill AJ, Oster N, Franke ED, Groggl M, Berman JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 1994;18: 83-90.

Gonçalves GS, Fernandes AP, Souza RCC, Cardoso JE, Oliveira-Silva F de, Maciel FC, Rabello A, Ferreira LCM. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and (*Viannia) braziliensis*. *Acta Trop.* 2005;161-167.

Gupta N. Goyal N. & Rastogi AK. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. Trends Parasitol. 2001;17(3):150-153.

Gupta S. Tiwari S. Bhaduri AP, Jain GK. Anilino-(2-bromophenyl) acetonitrile: a promising orally effective antileishmanial agent. Acta Trop. 2002;84:165-173.

Gupta S, Thapar MM, Wernsdorfer WH, Bjorkman A. *In vitro* interactions of artemisinin with atovaquone, quinine, and mefloquine against *Plasmodium falciparum*. Antimicrob. Agents. Chemother. 2002;46(5):1510-1515.

Gupta S, Ramesh Sharma SC, Srivastava VML. Efficacy of picroliv in combination with miltefosine, an orally effective antileishmanial drug against experimental visceral leishmaniasis. Acta Trop. 2005;94:41-47.

Hall MJ, Middleton RF & Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. J. Antimicrob. Chemother. 1983;11:427-433.

Hicks P, Zueiner RJ, Squires J, Savell V. Azitromycin therapy for *Cryptosporidium parvum* infection in four children injected with human immunodeficiency virus. J. Pediatr. 1996; 129:297-300.

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;141:161-168.

Hoebe KH, Gonzalez-Pamon N, Nijmeiger SM et al. Differential effect of pentoxifylline on the hepatic inflammatory response in porcine liver cell cultures. Increase in inducible nitric oxide synthase expression. Biochem. Pharmacol. 2001;61:1137-1144.

Huber W & Koella JC. A comparison of three methods of estimating EC<sub>50</sub> in studies of drug resistance of malaria parasites. Acta Trop. 1993;55(4):257-261.

Jha TK. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. Indian J. Med. Res. 2006;123:389-398.

Kaminsky R. Miltefosina Zentaris. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002; 3(4);550-554.

Kandpal M, Balana-Fouce R, Pal A, Guru PJ, Tekwani BL. Kinetics and molecular characteristics of arginine transport by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1995;71:193-201.

Kandpal M, Tekwani BL, Chauhan PMS, Bhaduri ap. Correlation between inhibition of growth and arginine transport of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro by dimidines. *Life Sci*. 1996;59:75-80.

Kayser O, Kiderlen AF & Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol. Res*. 2003;90:S55-S62.

Krolewiecki A, Leon S, Scott P, Abraham D. Activity of azithromycin against *Leishmania major* in vitro and in vivo. *Am. J. Med. Hyg*. 2002;67(3):273-277.

Lalak NJ & Morris DL. Azithromycin clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet*. 1993; 25(5):370-374.

Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2001;65(2):87-89.

Louria DB. Some aspects of the absorption, distribution, and excretion of amphotericin B in man. *Antibiot. Med. Clin. Ther*. 1958;5:295.

Lucumi A, Robledo SB, Gama V, Saravia NG. Sensibilidad de *Leishmania Viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA – protein complexes. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 1998;42:1990-1995.

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.

Maarouf M, Kouchkovsky Y de, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. Biochemical alterations in paramomycin – treated *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitol. Res.* 1997;83:198-202(a).

Maarouf M, Kouchkovsky Y de, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. *In vivo* interference of paramomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp. Cell. Res.* 1997;232:339-349(b).

Maarouf M, Adeline MT, Solignar M, Vautrin D, Robert-Gero M. Development and characterization of paramomycin – resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite* 1998;5:167-173.

Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, Carvalho EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized Trial mucosal leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 2007;44(6):788-793.

Maes L, Berghe VD, Germonprez N, Quirijnen L, Cos P, De Kimpe N, Puyvelde LV. *In vitro* and *in vivo* activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(1):130-136.

Marsden PD. Pentavalent Antimoials: old drugs for new diseases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1985;18(3):187-198.

Ménez C, Buye M, Besnard M, Farinotti R, Loiseau PM, Barratt G. Interaction between miltefosina and amphotericin B: consequences for their activities towards intestinal epithelial cells and *Leishmania donovani* promastigotas *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(11):3793-3800.

Miekely N, Mortani SR, Schubach AO. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002;372(3):495-502.

Mohebbali M, Fotouhi A, Hooshmand B, Zarei Z, Akhoundi B, Rahnema A, Razaghian AR, Kabir MJ, Nadim A. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for

the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. *Acta. Trop.* 2007;103(1):33-40.

Momeni AZ & Aminjavaheri M. Successful treatment of non – healing cases of cutaneous leishmaniasis, using a combination of meglumine antimoniate plus allopurinol. *Eur. J. Dermatol.* 2003; 13(1):40-43.

Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chemopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intravesical administration in Balb/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: a preliminary study. *Biomed. Pharmacother.* 2007;61:148-153.

Moore E, O'Flaherty D, Heuvelmans H, Seaman J, Veeken H, de Wit S and Davidson R. Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Bull. World Health Organ.* 2001;79(5): 388-393.

Mullen AB, Carter KC, Baillie AJ. Comparison of the efficacies of various formulations of Amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 1997;41(10):2089-2092.

Murray HW, Berman JD & Wright SD. Immunotherapy for intracellular *Leishmania donovani* infection gamma interferon plus pentavalent antimony. *J. Infect. Dis.* 1988;157:973-978.

Murray HW & Delph-Etienne S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. *J. Inf. Dis.* 2000;181:795-799.

Murray HW, Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45(8):2185-2197.

Neal RA & Croft SL. An *in vitro* system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1984;14:463-475.



Neal RA, Murphy AG, Olliaro P, Croft SL. Aminosidine ointments for the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; 81:734-737.

Neal RA, Allen S, McLoy N, Olliaro P, Croft SL. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995;35(5):577-584.

Olliaro PL & Bryceson ADM. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today* 1993; 9:323-328.

Oliveira-Silva F, Morais-Teixeira E de, Rabello A. Antileishmanial activity of azithromycin against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008; 78(5):745-749.

Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Res. Updates.* 2004;7(2):257-266.

Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2004;48:852-859.

Petit C, Yardley V, Gaboriau F, Bolard J, Croft SL. Activity of a heat – induced reformulation of amphotericin B deoxycholate (Fungizone) against *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999;43(2):390-392.

Prata A, Silva-Vergara ML, Costa L, Rocha A, Krolewiecki A, Silva JC, DE Paula EV, Pimenta Junior FG, Giraldo LE. Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003;36(1):65-9.

Puri SK & Singh N. Azithromycin: antimalarial profile against blood – and sporozoite - induced infections in mice and monkeys. *Exp. Parasitol.* 2000;94:8-14.

Rangel H, Dagger F, Hernandez A, Liendo A, Urbina JA. Naturally azole –resistant *Leishmania braziliensis* promastigotas are rendered susceptible in the presence of

terbinafine: comparative study with azole – susceptible *Leishmania Mexicana* promastigotas. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40(12):2783-2791.

Ritmeijer K, Veecken H, Melaku Y, Leal G, Amsalu R, Seaman J and Davidson RN. Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent. HIV co – infected patients have a poor outcome. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001;95(6):668-672.

Roberts A & Briggaman ND. The aromatic diamidines. *Intern. J. Dermatology* 1977;16(3):155-162.

Roberts WL & Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37(9):1842-1846.

Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimoniate (Glucantime). *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(5):1076-1082

Romero GA, Lessa HA, Orge MG, Marêdo VO, Marsden PD. Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two year follow-up. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998;31:511-516.

Romero GAS, Flores EMM, Noronha EF, Macedo VO. High frequency of skin reactions in patients with leishmaniasis treated with melgumine antimoniate contaminated with heavy metals. A comparative approach using historical controls. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003;98:145-149.

Saha AK, Mukherjee J, Bradiere A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochen. Parasitol.* 1986;19:195-200.

Santos AM dos, Noronha EF, Fereira LAM, Carranza-Tamayo CO, Cupolillo E, Romoreo GAS. Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra – indicações de tratamento com antimonial pentavalente. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008;41:444-448.

Scheinjeld NS, Tutone WD, Torres O, Weinberg JM. Macrolides in dermatology. *Dis. Mon.* 2004;50(7):350-368.

Schraner C, Hasse B, Hasse V, Baumann D, Faeh A, Beirg G et al. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clin. Infect. Dis.* 2005;40:120-124.

Schuster FL & Visvesvara GS. Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas. *J. Eukaryot Microbiol.* 1998;45:612-618.

Scott JAG, Davidson RN, Moody AH, Grant HR, Felmingham D, Scott AMS, Olliaro P, Bryceson ADM. Aminosidine (paramomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1992;86:617-619.

Seifert K, Matu S, Perez-Victoria FJ, Castanys S, Gramarro F, Croft SL. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int. J. Ant. Agents.* 2003;22:380-387.

Seifert F, Croft SL. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(1):73-79.

Seifert K, Perez-Victoria FJ, Stettler M, Sánchez-Cañete MP, Castanys S, Gramarro F, Croft SL. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. *Int. J. Ant. Agents.* 2007;30:229-235.

Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Quaiissi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37:1842-1846.

Sereno D & Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1997; 41(5):972-976.

Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouassi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1998; 42(12):3097-3102.

Serpa CG, Castro O de & Teixeira CC. Interações medicamentosas. In: Fuchs FD, Wannmacher L, Ferreira MBC. eds. *Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional*. 3ª ed. Guanabara Koogan, 2004 p. 67-72.

Shaked – Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel intracellular Sb<sup>v</sup> reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:3971-3976.

Shazad B, Abbaszadeh B, Khamesipour A. Comparison of topical paramomycin sulfate (twice/day) with intralesional meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. major*. *Eur. J. Dermatol.* 2005;15:85-87.

Sherwood JA, Gachihi GS, Muigai RK et al. Phase 2 efficacy trial of an oral  $\beta$ -aminoquinoline (WR 6026) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect. Dis.* 1994;19:1034-1039.

Silva Junior JB. Antimoniato de meglumina. Relatório técnico. Brasília: CENEPI/FUNASA 2000. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001;34:103-105.

Silva-Vergara ML, Silva LDEA, Maneira FR, da Silva AG, Prata A. Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 2004;46(3):175-177.

Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella M del C, Riarte A, Krolewiecki AJ. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007;40(6):627-630.

Singh N, Mishra PK, Kapil A, Arya KR, Maurya R, Dube A. Efficacy of *Desmodium gangeticum* extract and its fractions against experimental visceral leishmaniasis. J. Ethnopharmacology 2005;98:83-88.

Soares-Bezerra RJ, Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. Rev. Bras. Ciênc. Farm. 2004;40(2):139-149.

Soto JM, Fuya R, Herrera R, Berman J. Topical paromomycin / methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimoniate as treatment for american cutaneous leishmaniasis: controlled study. Clin. Infec. Dis. 1998;26:56-58.

Soto JM, Toledo JT, Gutierrez P, Arboleda M, Nicholls RS, Padilla JR, Berman JD, English CK, Grogl M. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (NR279396): phase 2 pilot study. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2002;66:147-151.

Soto J, Ararra BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Cutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. Clin. Inf. Dis. 2004;38:1266-1272.

Soto J, Valda-Rodriguez L, Toledo J, Vera-Navarro L, Luz M, Monastérios-Torrico H, Veja J and Berman J. Comparison of generic branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2004;71(5): 577-581.

Soto J & Toledo J. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. Lancet Inf. Dis. 2006;7:7.

Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, Croyal AK, Mandal AK, Voss A, Hilgard P, Murray HM. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. Lancet 1998;352:1821-1823.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop. Med. Int. Health. 2001;6:849-854.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Sinha PK, Bhattacharya SK. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *New England J. Med.* 2007;356:2571-2581.

Tanyuksel M, Bas AL, Araz E, Aybay C. Determination of intracellular efficacies of azithromycin against *Leishmania major* infection in human neutrophils *in vitro*. *Cell Biochem. Funct.* 2003;21(1):93-96.

Taylor KI & Taylor HR. Distribution of azithromycin for the treatment of trachoma. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(2):134-5.

Teixeira MCA, Santos RJ, Sampaio RB, Pontes-de-Carvalho L, dos Santos WLC. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol. Res.* 2002;88:963-968.

Thakur CP, Olliaro P, Gothoskar S, Bhowmick S, Choudhury K, Prasad S, Mukar M, Verma BB. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) with aminosidine (paromomycin) – antimonial combinations, a pilot study in Bihar, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992;86:615-616.

Tiphine M, Letscher-Beu V, Herbrecht R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologia characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl. Infect. Dis.* 1999;1(4):273-283.

Tracy JW, Webster Junior LT. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários: amebíases, giardíases, trichomoníases, trypanossomíases, leishmaníases e outras infecções causadas por protozoários. In: Handman JG, Gilman AG, Limbird LE, eds. *Goodman & Gilman's. As bases farmacológicas da terapêutica.* 10<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill, 2003. p.823-840.

Travi BL, Martinez JE & Zea A. Antimonial treatment of hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*: assessment of parasitological cure with different therapeutic schedules. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 1993;87(5):567-569.

Urbina J. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology.* 1997;114:591-599.

Van Voorhis WC. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. *Drugs* 1990;40(2):176-202.

Vandeputte J, Wachtel JL, Stiler ET. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by streptomyces II. The isolation and properties amphotericins. In: *Antibiotics Annual, 1955-1956*. New York: Medical Encyclopedia, 1956; p. 581-591.

Veeken H, Ritmeijer K, Seaman J and Davidson R. A randomized comparison of branded sodium stibogluconate and generic sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis under field conditions in Sudan. *Trop. Med. Int. Health* 2000; 5(5): 312-317.

Vehmeier K, Scheurich HP, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine mediated enhancement of T-cell responses to interleukin 2. *Cell. Immunol.* 1991;137:232-238.

Verma NK & Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Ant. Agents. Chemother.* 2004;48(8);3010-3015.

Vohringer HF & Arasteh K. Pharmacokinetic optimization in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin. Pharmacokinet.* 1993;24(5):388-412.

Yardley V & Croft SL. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Ant. Agents. Chemother.* 1997;41:752-756.

Yardley V & Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *International J. Ant. Agents.* 2000;13:243-248.

Yardley V, Croft SL, Dongker SDE, Dujardin JC, Koirala S, Rijal S, Miranda C, Llanos-Cuentas F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005;73(2):272-275.

World Health Organization. Report of the Scientific Working Group meeting on Leishmaniasis Geneva, 2–4 February, 2004. Geneva: WHO/TDR/SWG, 2004. 143p.

Disponível em: [http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg\\_leish.htm](http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_leish.htm) Acesso em: 27 dez. 2008.