

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Programa de Pós – Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Kelly Cristina Kato

**Efeito hepatoprotetor do ácido ascórbico e potencial  
benefício da via oral na quimioterapia antimonial em modelo  
murino de leishmaniose visceral**

Belo Horizonte, 2013.

Kelly Cristina Kato

**Efeito hepatoprotetor do ácido ascórbico e potencial benéfico da via oral na quimioterapia antimonial em modelo murino de leishmaniose visceral**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof Dr. Frederic Jean Georges Frezard.

Co-orientador: Prof. Dr. José Dias Corrêa-Junior

Área de concentração: Farmacologia

Belo Horizonte, 2013.

043

Kato, Kelly Cristina.

Efeito hepatoprotetor do ácido ascórbico e potencial benefício da via oral na quimioterapia antimonial em modelo murino de leishmaniose visceral [manuscrito] / Kato, Kelly Cristina Kato. - 2013.

121 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Frederic Jean Georges Frezard. Co-orientador: José Dias Corrêa-Junior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Leishmaniose - Teses. 2. Ácido ascórbico - Teses. 3. Antimônio - Teses. 4. Meglumina. 5. Estresse oxidativo - Teses. 6. Fisiologia - Teses. I. Frezard, Frederic Jean. II. Corrêa Júnior, José Dias. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.


CDU: 612


**"EFEITO HEPATOPROTETOR DO ÁCIDO ASCÓRBICO E  
POTENCIAL BENEFÍCIO DA VIA ORAL NA QUIMIOTERAPIA  
ANTIMONIAL EM MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE  
VISCERAL"**

**KELLY CRISTINA KATO**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 13 de novembro de 2013, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


  
**PROF. DR. ALEXANDRE BARBOSA REIS**  
NUPEB/UFOP

  
**PROF. DR. DALTON VALENTIM VASSALLO**  
CENTRO BIOMÉDICO/UFES

  
**PROF. DR. GUSTAVO BATISTA DE MENEZES**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROFA. DRª. SILVIA PASSOS ANDRADE**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROF. DR. JOSÉ DIAS CORRÊA JUNIOR**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CO-ORIENTADOR

  
**PROF. DR. FRÉDÉRIC JEAN GEORGES FRÉZARD**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 13 de novembro de 2013**

Este trabalho também contou com a colaboração de:

Ana Lúcia Teles Rabello, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz

Cynthia Peres Demicheli, Departamento de Química, ICEX, UFMG

Olguita Geralda Ferreira Rocha, Cetec-MG

Paula Campos Peixoto, Departamento de Patologia, ICB, UFMG

Maria de Fátima Leite, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG

Whocely Victor de Castro, Departamento de Farmácia, UFSJ

Neila Márcia Silva Barcellos, Departamento de Farmácia, EFAR, UFOP

Pascal Salaün, School of Environmental Sciences, University of Liverpool

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais  
voltará ao seu tamanho original."  
(Albert Einstein)*

*À minha filha Ana Eduarda e meu esposo Fernando, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão devido às privações decorrentes em prol desta jornada, pelo carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.*

### **Agradecimentos:**

A Deus todo poderoso que me guiou até o final deste trabalho.

Ao professor Dr Frederic Jean Georges Frezard, meu sincero agradecimento, pela sua dedicação, seu estímulo, pela sua inesgotável paciência, pelo aprendizado e pela oportunidade, que tanto contribuíram para minha formação e crescimento científico e intelectual.

Ào professor Dr. José Dias Côrrea Junior, na tarefa de injeção de ânimo, pela infinita disposição para ajudar, seu constante auxílio com dicas e orientações, sua presença em todos os momentos de dificuldade e, sobretudo, por acreditar em mim.

À Dra. Ana Lúcia Telles Rabello e sua equipe pela confiança e aprendizagem. Em especial, à Eliane de Moraes Teixeira, pela paciência e convivência.

Ao Liqbra e toda sua equipe: Marcela, Juliana, Betânia, Heder, Priscila e aos professores José Carlos e Antônio Carlos pelas risadas, pela disponibilidade do laboratório, pelos cafés, pela paciência nesses anos de luta.

À Dra. Maria de Fátima Leite e equipe Calciumlab pelos ensinamentos e oportunidades. À Lídia, Lili, Sandra, Carla, Claudilene, Gilson, Takinho, Pedro, Núbia, Camilas...pela convivência, risadas e choros.

À Dra. Cynthia Demicheli e sua equipe: Edgar e Luz, Bruno, Weverson e Érika pela disponibilidade do laboratório, pelo aprendizado e pelas risadas e apoio constante.

À equipe Labnano: Ana Paula, Flaviana, Priscila, Juliane, Guilherme, Mathius, Elisângela, Erly, Ligia, Virgínia, Nayara, Larissa, Moan, Adriel, Vicente, Mari, minha eterna gratidão, pelo apoio e convivência.

À Dra. Maria Norma Norma pelo carinho, atenção e ensinamentos.

Ao laboratório de Apoptose pela disponibilidade do laboratório, em especial Paula Campos e Núbia pela ajuda nas análises histopatológicas.

Ao Dr. Whocely Victor de Castro pela contribuição com os ensaios em Caco-2.

Aos meus ICs, Vicente e Adriel, meu sincero obrigado pela ajuda pessoal e profissional.

À Fla, Pri e Ju pela amizade, pela divisão de conversas e de lágrimas, seja de alegrias ou tristezas. Pela oportunidade de compartilhar momentos e minimizar meus momentos de dificuldades.

Aos meus pais Olga Sisue Mamose Kato (in memorian) e Paulo Mitihiro Kato, pelo seu exemplo de força e por todo amor e carinho.

À minhas amadas irmãs Regina e Ana Paula por acreditarem em mim e sempre estarem prontas a me apoiar nas horas difíceis.



Ao meu marido Fernando, pelo incentivo, companheirismo, dedicação e amor.

À minha querida e amada filha Ana Eduarda pela compreensão, paciência, carinho, alegrias e privações em todos os momentos desta jornada.

Aos colegas Reuni e tutores pela oportunidade e pelo aprendizado.

Aos secretários da Pós Graduação pelos serviços prestados e colaboração.

Aos colegas Gleicinha, Míriam, Hertz, Markim, Peterson, que compartilharam minhas alegrias e tristezas durante esta jornada.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esta conquista fosse alcançada.

---

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Ciclo da leishmaniose	2
<b>Figura 2</b>	Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo	3
<b>Figura 3</b>	Estruturas de complexos Sb-ligante na razão estequiométrica 1:1, 1:2, 2:2 e 2:3 propostas para o antimoniato de meglumina	10
<b>Figura 4</b>	Mecanismos de ação/toxicidade propostos por Wyllie e colaboradores (2004) baseado na interação com tióis e inibição da Tripanotona Redutase/Glutatona Redutase e indução de estresse oxidativo	13
<b>Figura 5</b>	Osmolaridade das soluções aquosas de AM, AM1 e Gluc a 25°C e 0,1 M de Sb	23
<b>Figura 6</b>	Parâmetros calculados a partir da quantificação de osmolaridade, concentrações de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> e Sb	24
<b>Figura 7</b>	Espécies predominantes identificadas no antimoniato de meglumina sintético e comercial	26
<b>Figura 8</b>	Porcentagem de Sb permeado através da membrana de celulose MWCO de 3000 daltons	27
<b>Figura 9</b>	Cinéticas de redução pela cisteína do Sb(V) a Sb(III) nos antimoniais pentavalentes AM, AM1 e Gluc a 37°C	28
<b>Figura 10</b>	Curvas de pseudo polarografia obtidas para os compostos AM1 e Glucantime® pela técnica de voltametria de redissolução anódica com eletrodo de ouro	29
<b>Figura 11</b>	Ilustração dos ensaios <i>in vivo</i> do tratamento com antimoniais em associação ou não com ácido ascórbico em camundongos fêmeas Balb/c infectados experimentalmente com <i>Leishmania infantum</i>	38
<b>Figura 12</b>	Esquema do processamento de rotina para histologia	40
<b>Figura 13</b>	Representação esquemática do princípio da técnica de TUNEL	42
<b>Figura 14</b>	Cargas parasitárias no fígado (A) e baço (B) de camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> após tratamento com diferentes compostos antimoniais. Antimoniais administrados por via intraperitoneal na dose de 80 mg Sb/kg/dia por 20 dias	45

---

<b>Figura 15</b>	Incorporação de Sb por macrófago peritoneal murino após incubação com 0,8 mM de Sb provenientes de AM, AM1 e Gluc por 4 horas	46
<b>Figura 16</b>	Concentração de Sb, no fígado de camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> , três dias após a última dose do tratamento intraperitoneal por 20 dias com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia)	47
<b>Figura 17</b>	Micrografias de hepatócitos de camundongos Balb/c infectados experimentalmente com <i>L. infantum</i> corados com H&E após tratamento com antimoniais sintéticos (AM e AM1) e comercial (80 mg Sb/kg/dia por 20 dias). Típica turgência, observada no Gluc; granulosidade intensa observada em AM; granulosidade menos intensa em AM1; e aspecto normal no grupo controle tratado com salina	49
<b>Figura 18</b>	Porcentagem de área lucente nos citoplasmas dos hepatócitos após tratamento intraperitoneal com diferentes antimoniais AM, AM1 ou Gluc na dose de 80 mg Sb(V) /kg/dia por 20 dias, em camundongos Balb/c infectados ou não com <i>L. infantum</i>	50
<b>Figura 19</b>	Micrografias mostrando aspectos histológicos da esquerda para direita coração, rins, pâncreas e baço murinos corados com a técnica de Hematoxilina & Eosina após tratamento com antimoniais.	51
<b>Figura 20</b>	Níveis de enzimas hepáticas de camundongos Balb/c sadios ou infectados com <i>L. infantum</i> , submetidos ou não ao tratamento intraperitoneal por 20 dias com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) (A) alanina aminotransferase (ALT) (B) aspartato aminotransferase (AST) e (C) fosfatase alcalina	53
<b>Figura 21</b>	Índice apoptótico avaliado através de H&E) (A) ou através da técnica de TUNEL (B) em cortes histológicos de fígado de camundongos sadios ou infectados com <i>L. infantum</i> submetidos ao tratamento com diferentes antimoniais pentavalentes (80 mg Sb/Kg/dia por 20 dias)	55
<b>Figura 22</b>	Micrografias ilustrando a apoptose dos hepatócitos através de H&E (coluna esquerda) ou da técnica de TUNEL (coluna direita) em corte histológico de fígado de camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> submetidos ao tratamento com diferentes antimoniais pentavalentes (80 mg Sb/Kg/dia por 20 dias)	56
<b>Figura 23</b>	Atividade peroxidase determinada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em corte histológico de fígado de camundongos Balb/c	57

---

---

	sadios ou infectados, tratados ou não com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia por 20 dias)	
<b>Figura 24</b>	Cargas parasitárias no fígado (A) e baço (B) de camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> após tratamento com diferentes compostos antimoniais em associação ou não com ácido ascórbico. Antimoniais e ácido ascórbico administrados por via intraperitoneal nas doses de 80 mg Sb/kg/dia e de 15 mg/kg/dia, respectivamente, por 20 dias	59
<b>Figura 25</b>	Concentração hepática de Sb em camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> três dias após a última dose do tratamento de 20 dias por via IP com antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) em associação ou não com AA (15 mg/kg/dia)	60
<b>Figura 26</b>	Micrografias de luz de hepatócitos de camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> corados com H&E após tratamento por via IP com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) em associação ou não com ácido ascórbico (15 mg/kg/dia) por 20 dias. Típica turgência, observado no grupo Gluc, granulosidade intensa observado em AM, granulosidade menos intensa em AM1, aspecto normal no grupo controle e aspecto típico normal nos grupos antimoniais associados ao AA ou tratados somente com AA	62
<b>Figura 27</b>	Efeito do co-tratamento com AA na porcentagem de área lucente no citoplasma de hepatócitos de camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> após tratamento por via IP com antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) em associação ou não com ácido ascórbico (15 mg/kg/dia) por 20 dias	62
<b>Figura 28</b>	Influência do AA (15 mg/kg/dia por 20 dias) na atividade da peroxidase em corte histológico de fígado de camundongos Balb/c sadios ou infectados com <i>L. infantum</i> e tratados ou não com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) por 20 dias por via IP. Atividade da peroxidase avaliada pela marcação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB)	63
<b>Figura 29</b>	Influência do co-tratamento com AA (15 mg/kg/dia) no índice apoptótico (H&E) em corte histológico de fígado de camundongos Balb/c sadios ou infectados com <i>L. infantum</i> e submetidos ao tratamento ou não com Gluc (80 mg Sb/kg/dia) por 20 dias por via IP	64
<b>Figura 30</b>	Influência do co-tratamento com AA (15 mg/kg/dia por 20 dias por via IP) no índice apoptótico dos hepatócitos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> que receberam Gluc ou AM1 (80 mg Sb/kg/dia) por 20 dias por via IP através da análise por TUNEL em cortes histológicos de fígado. Camundongos não infectados receberam salina	65

---

<b>Figura 31</b>	Micrografias de corte histológico de fígado, submetidos à técnica de TUNEL, provenientes de camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> e tratados ou não com Gluc e AM1 (80 mg Sb/kg/dia) na presença ou ausência de AA (15 mg/kg/dia) por 20 dias por via IP. Os grupos representados são: Gluc, Salina, AM1, Gluc + AA, Salina + AA e AM1 + AA. As células apoptóticas aparecem com marcação nuclear de coloração marrom	66
<b>Figura 32</b>	Curvas de crescimento de células HepG <sub>2</sub> , em função do tempo na presença de diferentes compostos antimoniais na concentração de 5 mM de Sb	67
<b>Figura 33</b>	Citotoxicidade dos diferentes compostos antimoniais (AM, AM1, Gluc) na concentração de 5 mM de Sb, determinada pelo método de MTT, após exposição de células HepG <sub>2</sub> por 24 hs	68
<b>Figura 34</b>	Produção de ROS em células HepG <sub>2</sub> medida através de intensidade de fluorescência da sonda DHE, por microscopia confocal, após exposição aos antimoniais sintéticos (AM, AM1) ou comercial (Gluc) por 24 hs na concentração de 5 mM de Sb	69
<b>Figura 35</b>	Micrografias de fluorescência de células HepG <sub>2</sub> carregadas com sonda DHE, após exposição aos antimoniais sintéticos (AM e AM1) ou comercial (Gluc) por 24 hs na concentração de 5 mM de Sb	70
<b>Figura 36</b>	Ilustração do protocolo de infecção e tratamento oral com diferentes compostos antimoniais em camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> e das avaliações realizadas	79
<b>Figura 37</b>	Representação esquemática do sistema de permeação de modelo intestinal utilizando células Caco-2	82
<b>Figura 38</b>	Farmacocinética sérica de diferentes compostos antimoniais (AM, AM1 ou Gluc) em camundongos Swiss após administração na dose de 300 mg Sb(V)/kg por via oral (A) ou endovenosa (B)	83
<b>Figura 39</b>	Farmacocinéticas do Gluc no fígado de camundongos Swiss após administração na dose de 300 mg Sb(V)/kg por via oral (A) ou endovenosa (B)	86
<b>Figura 40</b>	Cargas parasitárias no fígado (A) e baço (B) de camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> após tratamento com diferentes compostos antimoniais (300 mg Sb/kg/12 h) por via oral por 30 dias	88

---

- 
- Figura 41** Concentração hepática de Sb após 30 dias de tratamento em camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* com diferentes compostos antimoniais por via oral (AM, AM1 ou Gluc) na dose de 300 mgSb/kg/12h ou IP (Gluc 80 mg Sb/kg/24h) 89
- Figura 42** Porcentagem de áreas lucentes nos citoplasmas do fígado de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* após tratamento com diferentes compostos antimoniais por via oral (AM, AM1 ou Gluc (300 mg Sb/kg/12h) ou IP (Gluc 80 mg Sb/kg) 91
- Figura 43** Micrografias em microscópio óptico de fígado de camundongos Balb/c após tratamento com diferentes antimoniais (AM, AM1 ou Gluc) por via oral na dose de 300 mg Sb/kg/12h ou Gluc IP na dose de 80 mg Sb/kg/dia. Turgência observada em camundongos tratados com AM e Gluc<sub>IP</sub>. Aspecto normal em Salina. Predominante granulosidade em AM1 e Gluc<sub>oral</sub> 92
- Figura 44** Permeação de Sb *in vitro* através de monocamada de células Caco-2 a partir de diferentes compostos antimoniais. O lado apical das células foi exposto à solução do antimônio na concentração de 50 mM de Sb a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Amostras foram colhidas pelo lado basolateral para dosagem de Sb permeado. O Sb foi quantificado por ETAAS e foi determinado o coeficiente aparente de permeabilidade 94

---

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Resultados da análise elementar de C, Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> e Sb em formas sintéticas (AM e AM1) e comercial (Gluc) do antimoniato de meglumina liofilizadas	23
<b>Tabela 2</b>	Valores de osmolaridade e de concentração de meglumina, Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> , Sb calculados para o antimoniato de meglumina na concentração de 300 mg/ml	24
<b>Tabela 3</b>	Concentração dos metais-traços nos compostos antimoniais AM, AM1 e Gluc	30
<b>Tabela 4</b>	Parâmetros farmacocinéticos séricos do AM, AM1 e Gluc após administração oral na dose de 300 mg de Sb/kg em camundongos Swiss	82
<b>Tabela 5</b>	Parâmetros farmacocinéticos séricos do AM, AM1 e Gluc após administração endovenosa em camundongos Swiss na dose de 300 mg de Sb/kg em modelo murino	82
<b>Tabela 6</b>	Parâmetros farmacocinéticos de direcionamento de Sb para o fígado após administração oral ou endovenosa de Gluc na dose de 300 mg de Sb/kg em modelo murino	85
<b>Tabela 7</b>	Supressão da carga parasitária, em relação ao grupo Salina, no fígado e baço dos camundongos Balb/c infectados com <i>L. infantum</i> , submetidos ao tratamento por via oral com os diferentes compostos antimoniais	87

---

## Lista de abreviaturas

- $\Delta Q$ = quantidade de fármaco permeada no compartimento acceptor no intervalo de tempo
- $\Delta T$ = intervalo de tempo
- A= área superficial da membrana semipermeável
- AA- ácido ascórbico
- ALT- alanina aminotransferase
- AM- antimoniato de meglumina
- AM/CD- antimoniato de meglumina complexado a ciclodextrina
- AmB- anfotericina B
- As- arsênio
- ASC- área sobre a curva
- AST - aspartato aminotransferase
- ATP- adenosina trifosfato
- Ba-bário
- BPR- vermelho de bromopirrogalol
- $C_0$ = concentração inicial do fármaco no compartimento doador
- CEBIO- Centro de Bioterismo
- CETEC- Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais
- $C_{max}$ - concentração sérica máxima
- CPqRR- Instituto Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou Belo Horizonte
- Cys- cisteína
- Cys-Gly- cisteinil-glicina
- DAB- 3,3' diaminobenzidina
- DHE- diaminoetidina
- ECG- eletrocardiograma
- ESI-MS- espectrometria de massas após ionização por eletrodispersão
- ETAAS- espectroscopia de absorção atômica em forno grafite
- F- biodisponibilidade
- Gluc- Glucantime<sup>®</sup>
- GSH- glutationa
- GTP- guanosina trifosfato
- h- hora(s)



---

H&E- hematoxilina e eosina  
HIV- síndrome da imunodeficiência adquirida  
IA- índice apoptótico  
ICP-AES- espectrometria de absorção atômica com plasma induzido  
ICP-MS- espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado  
ICP-OES-Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido  
IP- intraperitoneal  
LC- leishmaniose cutânea  
LMC- Leishmaniose mucocutânea  
LT- leishmaniose tegumentar  
LV - Leishmaniose visceral  
min.- minuto (s)  
MRP- proteína de resistência múltipla  
MTT- 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazolium bromide tiazolil azul  
NO- óxido nítrico  
OMS- Organização Mundial da Saúde  
Papp- coeficiente de permeabilidade aparente  
Pb-chumbo  
ROS- espécies reativas de oxigênio  
Sb(III)- antimônio trivalente  
Sb(V)- antimônio pentavalente  
SFB- soro fetal bovino  
T(SH)2- tripanotona  
 $T_{1/2}$ = tempo de meia-vida  
TA- temperatura ambiente  
TEER- resistência elétrica transepitelial  
Tmax- Tempo para alcançar a concentração sérica máxima  
TRM- Tempo de residência média  
Vs- *versus*

---

## Resumo

Os antimoniais pentavalentes são fármacos de primeira escolha em vários países do mundo no tratamento das leishmanioses, como é o caso do antimoniato de meglumina no Brasil. Apesar de sua elevada eficácia, a quimioterapia antimonial apresenta importantes limitações, como a necessidade de doses repetidas por via parenteral e graves efeitos colaterais, que limitam a adesão dos pacientes. Os conhecimentos escassos sobre a composição química desses medicamentos e os mecanismos responsáveis pela sua toxicidade dificultam os progressos para a melhoria da quimioterapia antimonial. Buscando estabelecer estratégias para reduzir a toxicidade dos antimoniais pentavalentes durante o tratamento das leishmanioses, investigou-se, a composição química do antimoniato de meglumina, o papel do resíduo de antimônio trivalente (Sb(III)) na hepatotoxicidade deste fármaco em modelo murino de leishmaniose visceral (LV), o efeito do co-tratamento com ácido ascórbico (AA) e o benefício potencial da via de administração oral. A caracterização físico-química de formas sintéticas (AM1 e AM) e comercial (Gluc) do antimoniato de meglumina mostrou a predominância de um complexo Sb-meglumina (2:2) zwitteriônico no AM e AM1 e de um complexo Sb-meglumina (2:3) de carga positiva no Gluc. O teor de Sb(III) determinado por voltametria mostrou, no Gluc, valor correspondente a 24% do Sb total e, no AM1, teor 1,5 vez menor. Os teores de Sb(III) encontrados por fotometria foram muito menores e na seguinte ordem: AM > Gluc > AM1. AM apresentou também teores significativos dos elemento-traços potencialmente tóxicos, Pb e As. Os compostos AM, AM1 e Gluc apresentaram eficácias equivalentes no tratamento parenteral de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum*. Porém, apenas AM e Gluc promoveram hepatotoxicidade, como evidenciada por avaliações histopatológicas e do índice apoptótico dos hepatócitos. O aumento da atividade peroxidase no fígado dos animais tratados com AM e Gluc sugeriu a indução de um estresse oxidativo. A menor hepatotoxicidade do AM1 correlacionou-se com o menor teor de Sb(III) deste composto, indicando que o Sb(III) residual poderia contribuir para a hepatotoxicidade do Gluc. O co-tratamento dos camundongos infectados com AA reduziu significativamente as alterações hepáticas induzidas pelo Gluc, sem comprometer a eficácia do antimonial. Os compostos sintéticos administrados por via oral em camundongos apresentaram uma maior taxa de absorção intestinal e maior concentração hepática de Sb, quando

comparados ao Gluc. Os compostos sintéticos mostraram-se ainda mais eficazes por via oral que o fármaco comercial na redução da carga parasitária no baço no modelo murino de LV. Em conclusão, essa tese permitiu identificar três estratégias promissoras para reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia antimonial: o uso de antimonias pentavalentes com baixo teor de Sb(III); o co-tratamento com AA e o uso da via de administração oral para a LV.

**Palavras-chaves:** leishmaniose, ácido ascórbico, antimônio, antimoniato de meglumina, estresse oxidativo

---

## Abstract

Pentavalent antimonials are the first-line drugs in several countries worldwide for treatment of leishmaniasis, as it is the case of meglumine antimoniate in Brazil. Despite its high efficacy, antimonial chemotherapy shows important limitations, such as the need for repeated parenteral doses and several side effects that limit patient compliance. The scarce knowledge about the chemical composition of these drugs and the mechanisms responsible for their toxicity has also hindered progress towards the improvement of antimonial chemotherapy. In the search for strategies to reduce pentavalent antimony toxicity during leishmaniasis treatment, we investigated the chemical composition of meglumine antimoniate, the role of residual trivalent antimony (Sb(III)) in the drug hepatotoxicity in a murine model of visceral leishmaniasis (VL), the effect of co-treatment with the antioxidant ascorbic acid (AA) and the potential benefit of the oral route of administration. The physicochemical characterization of the synthetic (AM1 and AM) and commercial (Gluc) forms of meglumine antimoniate showed the predominance of a zwitterionic 2:2 Sb-meglumine complex in AM1 and AM and of a positively-charged 2:3 Sb-meglumine complex in Gluc. The Sb(III) content determined by voltammetry showed, in Gluc, 24% of total Sb and, in AM1, 1.5 times lower level. The Sb(III) contents found by photometry were much smaller and in the following order: AM > Gluc > AM1. AM also showed significant levels of the potentially toxic trace elements, Pb and As. The compounds AM, AM1 and Gluc showed equivalent antileishmanial efficacies following parenteral treatment in BALB/c mice infected with *L. infantum*. However, only AM and Gluc promoted hepatotoxicity, as evidenced by histopathological analysis and apoptotic index of hepatocytes. The increase of peroxidase activity in the liver of animals treated with AM and Gluc suggested an induction of oxidative stress. The lower hepatotoxicity of AM1 correlated with its lower level of Sb(III), indicating that the residual Sb(III) may contribute to Gluc hepatotoxicity. The co-treatment of infected mice with AA significantly reduced the hepatotoxicity of Gluc, without compromising its antileishmanial efficacy. AM and AM1 given orally to mice showed a higher rate of intestinal absorption and an increased hepatic concentration of Sb, when compared to Gluc. The synthetic compounds showed higher effectiveness by the oral route than the commercial drug, when evaluating the suppression of spleen parasite in mice infected with *L. infantum*. In conclusion, this

---

thesis identified three promising strategies to reduce the side effects of antimonial chemotherapy: the use of pentavalent antimony with low content of Sb(III), the co-treatment with AA and the use of the oral route for treatment of the LV.

**Key-words:** leishmaniasis, ascorbic acid, antimony, meglumine antimoniate, oxidative stress

---

**Sumário**

1.0	Revisão Da Literatura	1
1.1	Leishmaniose	1
1.1.1	Ciclo biológico e epidemiologia	1
1.1.2	Formas clínicas da leishmaniose	4
1.2	Tratamento das leishmanioses	5
1.3	Fármacos antimoniais pentavalentes: estrutura, composição química e mecanismo de ação	8
1.4	Toxicidade dos antimoniais pentavalentes	13
1.5	Influência do ácido ascórbico nas ações farmacológicas de antimoniais e arsenicais trivalentes	14
1.6	Biodisponibilidade dos antimoniais pentavalentes por via oral e influência da forma farmacêutica	15
2.0	Objetivos	17
3.0	Capítulo 1: Caracterização físico-química das formas sintética e comercial do antimoniato de meglumina	18
3.1	Introdução	19
3.2	Materiais e métodos	19
3.2.1	Preparação dos compostos antimoniais	19
3.2.2	Determinação de osmolaridade	20
3.2.3	Permeação através de membrana de celulose	20
3.2.4	Determinação fotométrica de Sb(III) residual	20
3.2.4.1	Determinação fotométrica	20
3.2.4.2	Determinação por voltametria	21
3.2.5	Determinação de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ,Cl <sup>-</sup> e metais-traços potencialmente tóxicos	21
3.2.6	Análise elementar de Carbono	21
3.2.7	Cinética de redução de Sb(V) pela cisteína	22
3.3	Resultados e Discussão	22
3.3.1	Identificação da espécie predominante presente no antimoniato de meglumina	22
3.3.2	Permeação através de membrana de celulose	27
3.3.3	Estudo de redução de Sb(V) a Sb(III) pela cisteína	27
3.3.4	Doseamento de Sb(III) residual	28
3.3.5	Determinação de metais – traços	29
3.4	Discussão	30
3.5	Conclusões do capítulo	33

---

4.0	Capítulo 2: Hepatotoxicidade dos antimoniais pentavalentes: possível papel da influência da associação com ácido ascórbico	35
4.1	Introdução	35
4.2	Materiais e métodos	35
4.2.1	Avaliação da incorporação intracelular de antimônio em macrófagos peritoneais	35
4.2.2	Estudo de eficácia e toxicidade em modelo murino de leishmaniose visceral	36
4.2.2.1	Infecção, tratamento e avaliação da eficácia	36
4.2.2.2	Concentração hepática de Sb	39
4.2.2.3	Análises histológicas	39
4.2.2.3.1	Índice apoptótico	40
4.2.3	Ensaio <i>in vitro</i> em células HepG2	43
4.2.3.1	Ensaio de proliferação celular	43
4.2.3.2	Estudo de citotoxicidade	43
4.2.3.3	Avaliação da produção de ROS	44
4.2.4	Análises estatísticas	44
4.3	Resultados	44
4.3.1	Comparação da eficácia dos diferentes compostos antimoniais em modelo murino de LV	44
4.3.2	Comparação da incorporação em macrófagos peritoneais	47
4.3.3	Comparação da captação hepática de Sb	47
4.3.4	Comparação da toxicidade após tratamento em modelo murino de LV	48
4.3.4.1	Alterações histopatológicas	48
4.3.4.2	Marcadores bioquímicos da função hepática	52
4.3.4.3	Índice apoptótico no tecido hepático	54
4.3.4.4	Atividade da peroxidase	57
4.3.5	Influência do co-tratamento com ácido ascórbico na eficácia e toxicidade dos diferentes compostos antimoniais	58
4.3.5.1	Interferência do AA na eficácia e no acúmulo hepático de Sb	58
4.3.5.2	Interferência do AA na toxicidade dos antimoniais	60
4.3.5.2.1	Alterações histopatológicas	60
4.3.5.2.2	Indução da atividade de peroxidase	62
4.3.5.2.3	Indução de apoptose dos hepatócitos	63
4.3.6	Citotoxicidade e indução da produção de ROS em células HepG2	67
4.3.6.1	Inibição do crescimento celular e citotoxicidade	67
4.3.6.2	Produção de ROS	69
4.4	Discussão	71
4.5	Conclusões do capítulo	73

---

5.0	Capítulo 3: Possível benefício da via oral de administração do antimoniato de meglumina	76
5.1	Introdução	76
5.2	Materiais e métodos	77
5.2.1	Estudos farmacocinéticos	77
5.2.2	Estudo de eficácia e toxicidade por via oral	78
5.2.3	Concentração hepática de Sb após tratamento oral	80
5.2.4	Análise histológica do fígado	80
5.3.5	Estudo de permeação dos compostos antimoniais em modelo <i>in vitro</i> de epitélio intestinal	80
5.2.6	Análise estatística	82
5.3	Resultados	82
5.3.1	Estudos farmacocinéticos dos compostos antimoniais por via oral em camundongos	82
5.3.2	Eficiência da via de administração oral para o direcionamento do Sb para o fígado	85
5.3.3	Eficácia por via oral em modelo murino de LV	87
5.3.4	Concentração hepática de Sb	89
5.3.5	Alterações histopatológicas no fígado após tratamento	90
5.3.6	Estudo de permeação dos compostos antimoniais em modelo <i>in vitro</i> de epitélio intestinal	93
5.4	Discussão	94
5.5	Conclusões do capítulo	96
6.0	Conclusão geral	98
7.0	Referências bibliográficas	99
8.0	Anexo	113



## **1. - Revisão da Literatura**

### **1.1.- Leishmaniose**

#### **1.1.1- Ciclo biológico e epidemiologia**

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A *Leishmania* apresenta um ciclo de vida digenético (heteroxênico), alternando em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, sendo estes os responsáveis pela transmissão dos parasitos de um mamífero a outro. Nos flebotomíneos, as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo (Gontijo e Carvalho, 2003). No hospedeiro vertebrado, os parasitos são fagocitados por macrófagos e células dendríticas da derme. Após a internalização dos promastigotas no fagossoma, ocorre fusão com lisossomas e os parasitos sobrevivem no fagolisossoma. Durante este processo, os promastigotas transformam-se em amastigotas em 12 a 24 horas e a replicação através da divisão binária continua no compartimento fagolisossoma.

Quando o flebotomíneo faz o repasto sanguíneo de um hospedeiro vertebrado infectado, ele ingere macrófagos e monócitos contendo amastigota. As amastigotas são liberados no trato digestivo do inseto onde eles diferenciam em promastigotas flagelados. Através de um processo chamado metaciclogênese, em que a divisão, em forma procíclica não infectante adquire virulência e se transforma em forma não divisível e infectante denominada forma metacíclica. As promastigotas metacíclicos migram para a faringe e cavidade bucal, pronto para transmissão durante o próximo repasto sanguíneo (Van Assche et al. 2011) (Fig 1).

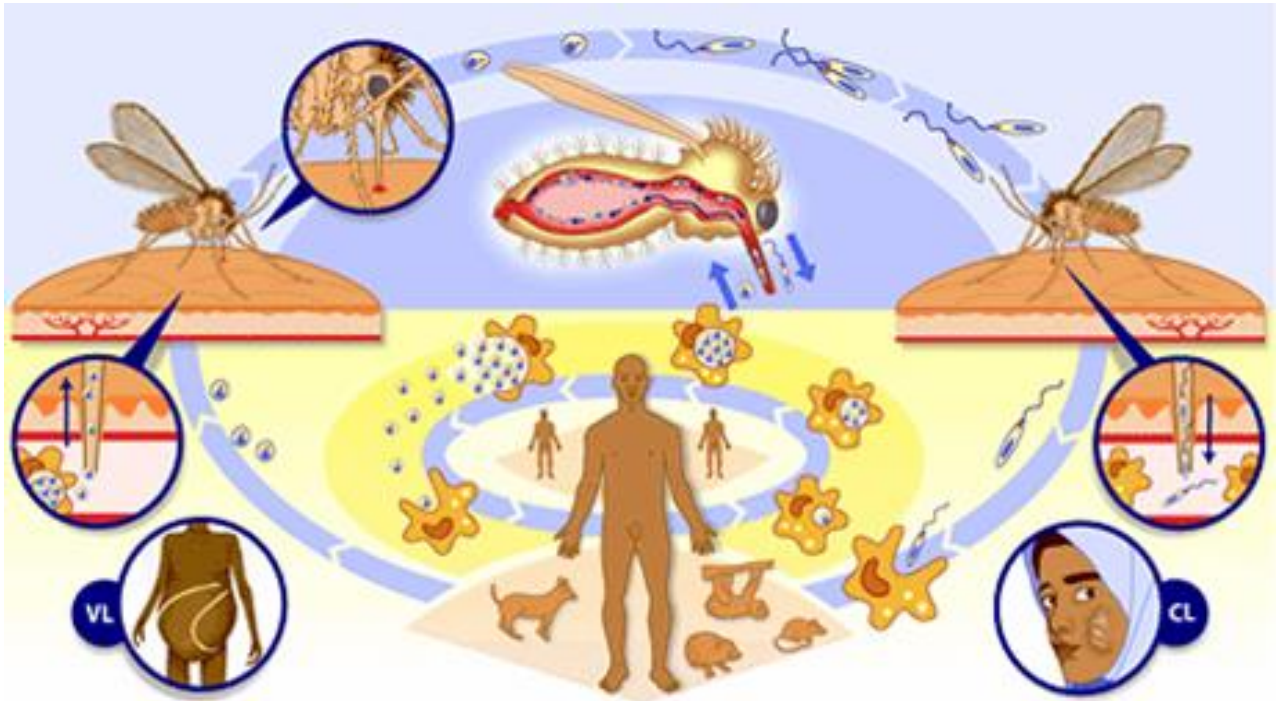


Figura 1: Ciclo biológico da leishmaniose. Para maiores detalhes ver item 1.1.1

A maioria das leishmanioses são zoonoses, apesar da existência da forma antroponótica, em que humanos são o único reservatório sem necessidade de um hospedeiro reservatório não humano para completar o ciclo. O reservatório hospedeiro consiste em várias espécies mamíferas incluindo cães, roedores e marsupiais que são responsáveis pela manutenção a longo prazo da leishmania na natureza. A maioria dos reservatórios hospedeiros são bem adaptados e desenvolvem sintomas subclínicos ou apenas leves infecções que podem persistir por anos.

Uma importante exceção é o cão que pode desenvolver uma doença generalizada e fatal (Van Assche et al. 2011). O cão é considerado o mais importante reservatório, quando se considera a forma zoonótica da LV, sendo responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, quer pela alta prevalência da doença entre estes animais, quer pela presença de formas amastigotas na pele e pela sua proximidade ao homem. Por esta razão, esses animais são considerados alvos estratégicos para medidas de controle da doença (Alvar et al. 2004; Baneth et al. 2002; Moreno & Alvar 2002). No âmbito doméstico, a

maioria dos cães com sorologia reagente não apresenta sinais clínicos, entretanto, podem, como reservatórios, infectar os flebotomíneos (Moreno & Alvar 2002; Silva et al. 2005). O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano. Dessa forma, no Brasil, o fato dos cães serem o principal reservatório e responderem apenas parcialmente aos medicamentos existentes implicam na proibição do tratamento de cães com fármacos destinados ao uso humano (portaria 1426/2008).

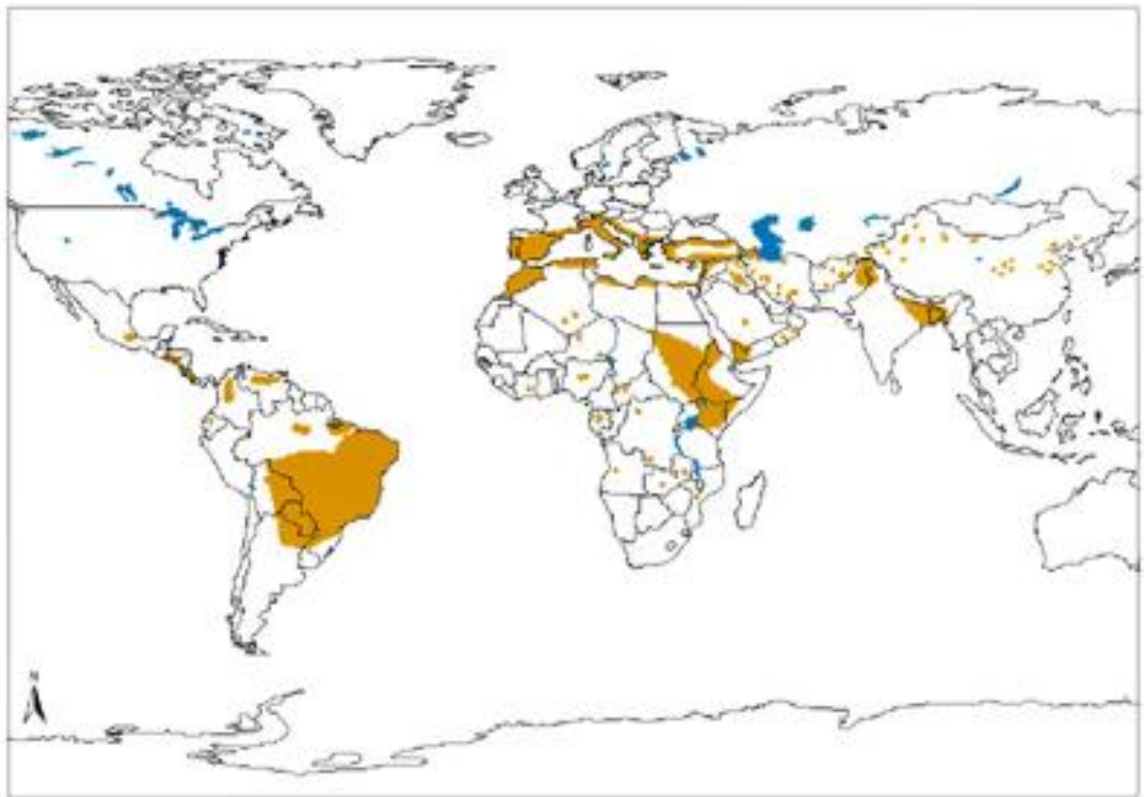


Figura 2: Distribuição Geografica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo. Fonte pesquisada em 21 de junho de 2013: [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)

Segundo estudo de Alvar e colaboradores (2012), a leishmaniose apresenta transmissão endêmica em 98 países e em 5 continentes no mundo. No total, dados oficiais de mensuração de casos de leishmaniose mostram mais de 58 000 novos casos de leishmaniose visceral (LV) por ano e 220 000 casos de

---

leishmaniose cutânea (LC). Mais de 90% dos casos globais de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil como ilustrado na Fig. 2. A leishmaniose cutânea é distribuída mais amplamente, com cerca de um terço dos casos ocorrendo em três regiões epidemiológicas: Américas, Bacia do Mediterrâneo e Ásia. Os dez países com maior número de casos são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Norte do Sudão, Costa Rica e Peru, sendo que juntos correspondem a 70-75% da incidência global de LC. Dados de mortalidade são escassos e representam apenas dados de óbitos ocorridos em hospitais, sendo estimado 20 000 a 40 000 casos de mortes por ano (Alvar et al. 2012).

### **1.1.2- Formas clínicas da leishmaniose**

A doença possui forma diversificada, sendo dividida clinicamente em: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), que se subdivide em: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (Van Assche et al. 2011, Lindoso et al. 2012).

A LV, também conhecida como calazar é caracterizada pela multiplicação da leishmania nas células fagocíticas do sistema mononuclear sistêmico (Berman 1997). A *Leishmania (Leishmania) infantum* é o agente etiológico responsável pela LV na Europa, Ásia e no Norte da África e nas Américas. O parasito antroponótico *Leishmania donovani* é mais freqüente na África e Índia (Davidson 1999; Haldal et al. 2011, Lindoso et al. 2012). A LV clássica apresenta como quadro clínico: febre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e perda de peso. Se não tratada, a LV acarreta a morte (Davidson 1999, Singh e Sivakumar 2004; Olliaro et al. 2005; OMS 2009, 2010; Lindoso et al. 2012), sendo responsável por milhares de mortes ao ano (Oliveira et al. 2010).

A LV tornou-se uma infecção oportunista preocupante no cenário atual, por ser frequentemente associada com a infecção de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), inclusive em países em desenvolvimento (Berman, 1997; Desjeux e Alvar, 2003) pois os pacientes acometidos com HIV possuem alta carga parasitária e baixa resposta imune, respondem lentamente ao tratamento

---

com altas taxas de recidivas e podem se tornar reservatório de formas resistentes do parasito ao medicamento (Croft et al. 2006).

Já as manifestações da LT são variáveis e classificadas de acordo com sua localização. A doença denominada LC apresenta lesões do tipo pápulas que progridem a úlceras e podem curar espontaneamente em meses a anos com cicatrizes, caracterizando lesões de pele desfigurantes, mas é uma forma não letal (Berman 1997). A progressão da forma cutânea depende da espécie de leishmania envolvida e da resposta imune do hospedeiro (Lindoso et al. 2012). Em geral, os membros do subgênero *Leishmania* (*L. (L.) mexicana*, *(L.) amazonensis*, *(L.) venezuelensis*) e do sub-gênero *Viannia* (*L.(V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L.(V.) guyanensis*) são encontrados no Novo Mundo e espécies do subgênero *Leishmania* (*L.) tropica* e (*L.) major* são os responsáveis por esta patologia no Velho Mundo. A leishmaniose mucocutânea (LMC), também conhecida como espúndia, apresenta condição de difícil de tratamento, e é caracterizada por uma infecção da mucosa nasal que pode envolver a orofaringe e laringe (Berman 1997; Gontijo e Carvalho 2003). Geralmente não apresenta cura espontânea (Berman 1997). A LMC é causada por *L. braziliensis* e ocasionalmente por *L. panamensis* e *L. guyanensis* no Novo Mundo. Cerca de 90% da LMC ocorre na Bolívia, Brasil e Peru (Van Assche et al. 2011).

## 1.2- Tratamento das leishmanioses

Na ausência de vacinas, o tratamento é baseado na utilização de quimioterápicos (Mitropoulos et al. 2010). O arsenal terapêutico atualmente disponível para o tratamento das leishmanioses consiste em fármacos desenvolvidos inicialmente na década de 50 incluindo os antimoniais pentavalentes, comercialmente conhecidos como Pentostam<sup>®</sup> e Glucantime<sup>®</sup>, pentamidina, várias formulações de anfotericina B, paramomicina e miltefosina. Na maior parte das áreas endêmicas, a escolha do tratamento é baseada em considerações econômicas (Vanlerberghe et al. 2007). Além disso, novos obstáculos surgiram dificultando o tratamento desta doença como a co-existência de novas doenças infecciosas em todo o mundo como a AIDS, desenvolvimento de resistência à

---

terapia convencional (principalmente na Índia), custos proibitivos para utilização de novas classes terapêuticas desenvolvidas e ao acesso limitado à terapia em locais onde já existem problemas como má nutrição (Murray 2000).

Os antimoniais pentavalentes como o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) são os fármacos de primeira escolha para o tratamento de todos os tipos de leishmaniose em vários países no mundo, incluindo o Brasil (Berman 1997, Balana-Fouce et al. 1998, Davidson 1999, Olliaro et al. 2005). O antimoniato de meglumina é disponível em países que falam francês, espanhol e português; o estibogluconato é disponível em países de língua inglesa (Balana-Fouce et al. 1998). Glucantime<sup>®</sup> e Pentostam<sup>®</sup> são considerados equivalentes em parâmetros de eficácia clínica, efeitos adversos, farmacocinética e mecanismos de ação (Henaó et al. 2004).

Apesar de sua elevada eficácia e de seu uso como fármaco de primeira escolha há mais de 50 anos, os compostos antimoniais estão longe de serem drogas ideais. Esses medicamentos apresentam limitações que incluem: necessidade de doses repetidas por via parenteral, custo elevado e graves efeitos colaterais, que limitam a adesão dos pacientes ao tratamento e favorecem o abandono e má utilização dos medicamentos (Aronson et al. 1998; Boer et al. 2009; Mitropoulos et al. 2010). Uma limitação adicional é o aparecimento de formas resistentes do parasito (Berman 1997).

Os relatos de toxicidade incluem a elevação nos níveis de amilase e de enzimas hepáticas, trombocitopenia, leucopenia e prolongamento de intervalo QT do eletrocardiograma (ECG). Além disto, há relatos de resistência aos antimoniais em países como a Índia, especialmente na região de Bihar (Sundar et al. 2001; Murray et al. 2001; Ouellette et al. 2004; Croft et al. 2006).

Outras alternativas de tratamento para a leishmaniose incluem: pentamidina, anfotericina B, paramomicina e miltefosina.

A pentamidina, uma diabenzomidina, atua sobre mitocôndrias causando a desintegração de DNA cinetoplasmático (Basselin et al. 2002). Bryceson e colaboradores (1985) relataram um ensaio clínico em pacientes com LV, no qual a pentamidina foi administrada na dose de 4 mg/kg, 3 vezes por semana, por via intramuscular durante 39 semanas e mostrou ser eficaz para 5 indivíduos no total de

---

8 pacientes. Por outro lado, há relatos de toxicidades no uso de pentamidina como hipotensão, taquicardia, hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e dor no caso da administração intramuscular (Berman, 1997; Sundar 2001; Ouellette et al. 2004). Uma outra limitação adicional é o aparecimento de forma resistente do parasito (Berman 1997).

A anfotericina B (AmB), um antibiótico poliênico complexa com o ergosterol do parasito formando poros que alteram o equilíbrio iônico levando à morte celular (Freitas-Junior et al. 2012). A dose recomendada pela OMS é 0,5 a 1 mg/kg/dia via perfusão lenta. A anfotericina B é a droga de escolha para o tratamento da LV em pacientes grávidas. Apesar de sua alta eficácia, esse fármaco gera nefrotoxicidade, febre e cardiotoxicidade (Berman 1997). A administração em hospital bem equipado é aconselhável devido principalmente à nefrotoxicidade (Boer et al. 2009). Formulações lipídicas de AmB, como anfotericina B lipossomal, dispersão coloidal ou complexo lipídico são ótimas alternativas devido aos seus efeitos colaterais reduzidos, porém seu preço elevado dificulta a utilização dos novos medicamentos em países em desenvolvimento (Berman 1997; Ouellette et al. 2004, Vanlerberghe et al. 2007).

A paramomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, inibe a função mitocondrial da *Leishmania* (Almeida e Santos, 2011). A posologia usualmente recomendada é 12 mg/kg/dia por via intramuscular ou endovenosa. A nefrotoxicidade e ototoxicidade deste aminosídeo são os principais efeitos indesejados (Berman 1997). Seu uso como monoterapia é pouco eficaz, quando comparado à quimioterapia antimonial (Berman 1997). Além disso, a paramomicina já apresenta resistência na Índia para LV (Boer et al. 2009).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), interfere especificamente no metabolismo lipídico do parasito e, apesar de apresentar elevada eficácia por via oral, gera efeitos colaterais como teratogenicidade e distúrbios intestinais (Sundar et al. 2002, Freitas-Junior et al. 2012) e apresenta rápido desenvolvimento de resistência (Vanlerberghe et al. 2007, Boer et al. 2009). Adicionalmente parece ser menos ativa nas espécies mais prevalentes no Brasil: *L. infantum* e *L. braziliensis* (Berman 1997; Soto et al. 2004, Morais Teixeira et al. 2011).

---

As importantes limitações dos medicamentos atualmente disponíveis como mostrado acima, justificam a busca de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose. Ainda que a terapia combinada têm melhorado a eficácia de tratamentos em pacientes co-infectados com HIV, casos caracterizados por uma baixa eficácia das monoterapias são bastante relatados (Bryceson 2001, Boer et al. 2009, Griensven et al. 2010).

Neste contexto, combinações de fármacos que incluam os antimoniais pentavalentes têm sido recomendadas, buscando maior eficácia, redução da dose, dos efeitos colaterais e menor duração do tratamento e prevenção de falhas terapêuticas (Lindoso et al. 2012).

A atual falta de um significativo retorno comercial com medicamentos para doenças negligenciadas como a leishmaniose, têm resultado em financiamento e comprometimento insuficientes tanto do setor público quanto da indústria farmacêutica para pesquisa e desenvolvimento nesta área (Ridley et al. 2003, Frezard et al. 2009). Neste contexto, estratégias para melhorar os fármacos existentes têm maiores chances de sucesso que aquelas baseadas no descobrimento de novas entidades químicas (Frezard e Demicheli 2010). O estudo de novas formulações passíveis de serem administradas por vias não invasivas como a oral e tópica e a busca de novas associações de fármacos que possam diminuir os efeitos colaterais e melhorar a melhor adesão do paciente à terapia são caminhos promissores (Santos et al. 2008).

### **1.3 Fármacos antimoniais pentavalentes: estrutura, composição química e mecanismo de ação**

Apesar do emprego do antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose há mais de 50 anos, a estrutura e composição química do composto, igualmente ao gluconato de antimônio (V) sódico, ainda não foram totalmente elucidadas (Berman 1997; Frezard et al. 2009; Haldar et al. 2011).

Demicheli e colaboradores propuseram, em 2003, novas rotas sintéticas para o antimoniato de meglumina utilizando duas fontes diferentes de Sb pentavalente: o pentacloreto de antimônio ( $\text{SbCl}_5$ ) gerando o composto que neste trabalho



---

denominaremos AM, o hexahidroxiantimonato de potássio ( $\text{KSb}(\text{OH})_6$ ) dando origem ao composto que denominaremos AM1.

O trabalho pioneiro de caracterização do antimoniato de meglumina comercial (Glucantime<sup>®</sup>) realizado por Roberts e colaboradores (1998) através da espectrometria de massas (ESI-MS) no modo positivo, revelou que o antimoniato de meglumina consiste de uma mistura de complexos com diferente grau de polimerização com fórmula geral (meglumina-Sb)-meglumina. Ao analisar os compostos antimoniais AM e AM1 por ESI-MS, Demicheli e colaboradores (2003) observou que os mesmos apresentam espécies qualitativamente similares ao produto comercial.

Os novos compostos também mostraram similar eficácia ao produto comercial após administração parenteral em modelo murino de LC (Dzamtika et al. 2006). Frezard e colaboradores (2008) sugeriram a partir de estudo do composto AM por ESI-MS nos modos positivo e negativo que o composto é constituído por uma mistura de complexos Sb-ligante na razão estequiométrica 1:1, 1:2, 2:2 e 2:3 (Fig. 3). Observou-se ainda a predominância de espécies zwitteriônicas em solução aquosa de AM. Entretanto, os estudos realizados até hoje não permitiram identificar a espécie química predominante em solução concentrada dos antimoniais pentavalentes. Esse dado seria uma informação importante já que a forma química destes compostos deve influenciar a farmacocinética, captação pelo sistema retículo - endotelial e metabolismo intracelular do antimônio pentavalente (Frezard et al. 2009). A Figura 3 mostra as estruturas propostas para os principais complexos Sb-ligante em solução de antimoniato de meglumina.

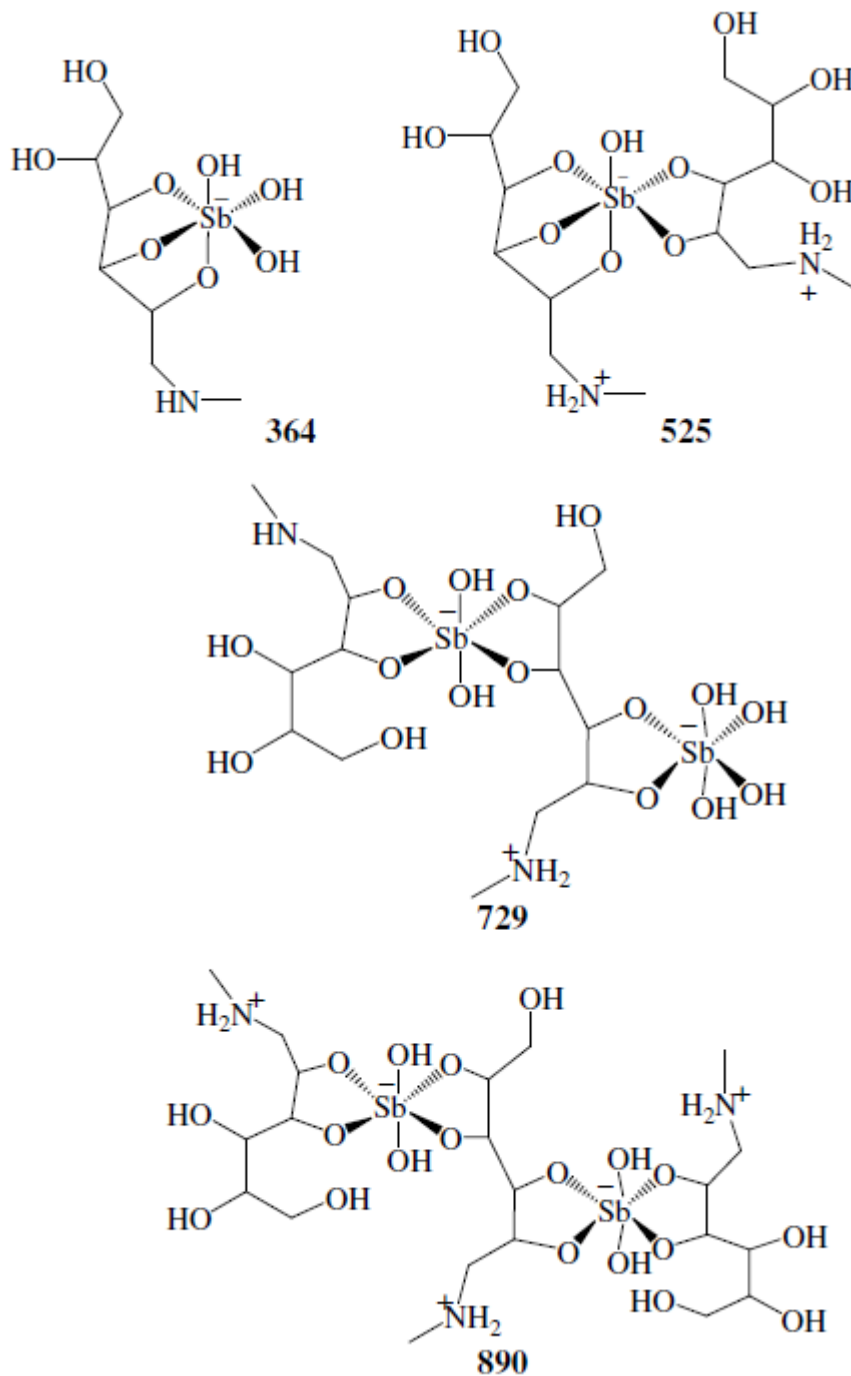


Figura 3: Estruturas de complexos Sb-ligante na razão estequiométrica 1:1, 1:2, 2:2 e 2:3 propostas para o antimoniato de meglumina de acordo com Frezard et al. 2008.

No ano de 2001, foi relatada a existência de lotes do antimoniato de meglumina da Eurofarma Laboratórios LTDA contendo altos níveis de arsênio e chumbo, e, devido à correlação desses metais com efeitos graves no organismo

---

humano tais como diminuição de leucócitos e hemácias no sangue, efeitos aditivos nos tecidos respiratórios e sistema nervoso central, alterações severas no ritmo cardíaco e aumento do risco de câncer, foi recomendada a suspensão da utilização desses lotes, que já se encontravam na rede de saúde (Silva Junior, 2001). Em outro estudo, relatou-se em pacientes tratados com antimoniato de meglumina da Eurofarma Laboratórios Ltda (São Paulo, Brasil) uma elevada incidência de reação cutânea (*rash* cutânea) quando comparado a outro grupo que recebeu o Glucantime<sup>®</sup> da Rhodia Farma (São Paulo, Brasil) (Romero et al. 2003). Esta alta frequência de reações de pele foi atribuída à contaminação com metais pesados incluindo chumbo, arsênio e cádmio. A concentração de antimônio trivalente (Sb(III)) também foi superior no lote da Eurofarma. Todos os pacientes com reações cutâneas do grupo foram instruídos a interromper o tratamento (Romero et al. 2003). Outro contaminante importante nos antimoniais pentavalentes é o Sb(III) cuja concentração depende do lote e do processo de síntese (Silva Junior, 2001; Romero et al. 2003; Dzamitika et al. 2006).

Foi observada uma correlação entre o teor de Sb(III) residual no antimoniato de meglumina e sua citotoxicidade em linhagem de células tumorais (Dzamitika et al. 2006) e foi levantado a hipótese de que o Sb(III) residual seria responsável pela toxicidade *in vivo* dos antimoniais pentavalentes (Frezard et al. 2009).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes também não foi totalmente elucidado. A depleção de níveis intracelulares de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) devido à interferência na glicólise e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos em amastigotas foi proposta como possível mecanismo de ação (Peters 1981; Berman 1985). Outro modelo geralmente aceito, apresentado pela primeira vez em 1943 por Goodwin e Page, é o que descreve o Sb(V) como um pró-fármaco, sendo o Sb(V) reduzido à forma ativa e tóxica Sb(III). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa indicaram que biomoléculas que contém o grupo sulfidríla (tiol) como glutationa (GSH), principal tiol do citosol de células mamíferas; cisteína (Cys) e cisteinil-glicina (Cys-Gly), tióis predominantes no lisossomo; e tripanotona (T(SH)<sub>2</sub>), principal tiol intracelular do parasito *Leishmania*, podem ser os responsáveis por esta

---

conversão. Além disso, esta redução é favorecida em pH ácido e temperatura elevada, características semelhantes aos fagolisossomos, local onde o parasito reside (Frezard et al. 2001; Ferreira et al. 2003, 2006).

Há evidência que o Sb(III) é substancialmente mais potente que o Sb(V) contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania sp.*, o que reforça a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do Sb(V) à Sb(III) sendo, neste caso, o Sb(III) a forma ativa final (Serenio et al. 1998, Ephros et al. 1999). Recentemente, esse modelo obteve suporte pela observação da redução de Sb(V) a Sb(III) (Hansen et al. 2011), após exposição *in vitro* de linhagem celular de macrófagos humano (Mono Mac 6) ao antimonial pentavalente. Também foi evidenciada redução de Sb(V) a Sb(III) em paciente tratado com antimoniato de meglumina (Burguera et al. 1993).

Wyllie e colaboradores (2004, 2006) relataram que Sb(III) promove um desbalanço no metabolismo dos tióis tanto em linhagem de células leucêmicas quanto no parasito *Leishmania sp.*, consistindo na redução da concentração intracelular de tiol e no aumento da relação tiol oxidado/tiol reduzido. Esses efeitos foram atribuídos à complexação do Sb(III) pelos tióis intracelulares na forma reduzida e à inibição da glutatona redutase em células de mamíferos e da tripanotona redutase em *Leishmania sp.* como mostrado na Figura 4. Considerando que tióis intracelulares reduzidos participam da proteção da célula contra espécies reativas de oxigênio (ROS), a exposição das células ao Sb(III) apresenta potencial para aumentar o estresse oxidativo tanto em células de mamíferos quanto em *Leishmania sp.* (Wyllie et al. 2004, 2006). Em parasitos de *Leishmania sp.* sensíveis, fármacos anti-leishmaniais como os antimoniais, miltefosina e anfotericina B provocam morte celular através de apoptose associada ao aumento de ROS (Moreira et al. 2011).

Tióis possuem um duplo papel na farmacologia dos antimoniais pentavalentes: por um lado, promoveria a ativação dos fármacos através da redução de Sb(V) a Sb(III) e, por outro lado, atuariam na detoxificação através da formação de conjugados com Sb(III) e favorecendo o efluxo e/ou sequestro do Sb, o que poderia prejudicar a eficácia dos antimoniais (Wyllie et al. 2004, 2006).

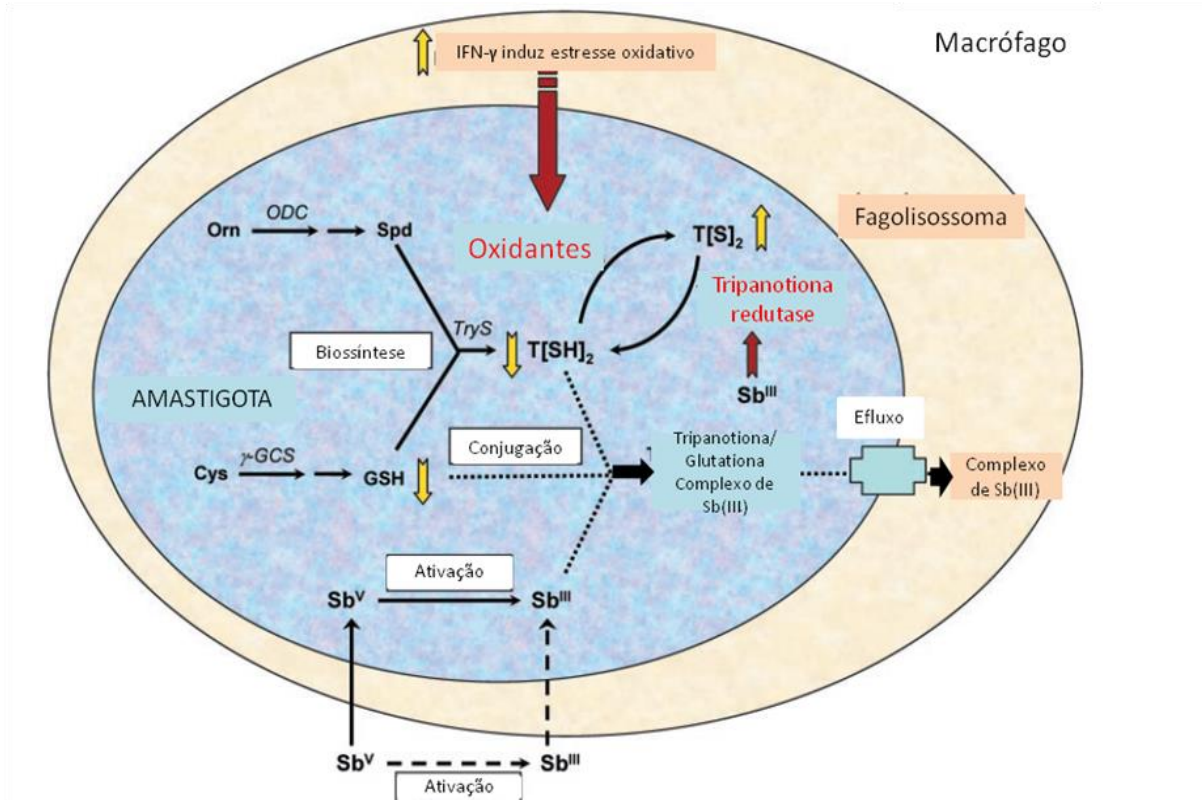


Figura 4: Mecanismos de ação/toxicidade propostos por Wyllie e colaboradores (2004) baseado na interação com tióis e inibição da tripanotona redutase/glutationa redutase e indução de estresse oxidativo.

#### 1.4- Toxicidade dos fármacos antimoniais pentavalentes

O tratamento das leishmanioses com antimoniais pentavalentes promove vários efeitos adversos como mialgia, pancreatite, alterações eletrocardiográficas e desordens hepáticas que se manifestam pelo aumento nos níveis séricos de transaminases e fosfatase alcalinas (Ballou et al. 1987, Alkhawajah et al. 1992, Hepburn et al. 1993, Berman, 1997; Singh e Sivakumar 2004, Croft et al. 2006; Ikeda-Garcia et al. 2007; Santos et al. 2008, Mitropoulos et al. 2010). Grimaldi e colaboradores (2010) realizaram estudo em *Macaques Rhesus* (macaca mulata) infectadas com *L. braziliensis* e observaram que o tratamento com antimoniato de meglumina resultou em patologia hepática caracterizada por necrose hepatocelular, infiltrado inflamatório e obliteração sinusóide.

Considerando que o Sb(V) é reduzido a Sb(III) no hospedeiro vertebrado (Burguera et al. 1993) e que o Sb(III) é mais citotóxico que o Sb(V), é geralmente

---

proposto que a toxicidade dos antimoniais pentavalentes seria mediada pela forma trivalente. O fato dos efeitos colaterais do tratamento com antimoniais trivalentes serem muito semelhantes àqueles do tratamento com pentavalentes reforça esse modelo. Neste contexto, um dos mecanismos responsáveis pela toxicidade dos antimoniais pentavalentes poderá ser a interferência do Sb(III) no metabolismo dos tióis e a geração de estresse oxidativo (Wyllie et al. 2006). Da mesma forma, o tártaro emético (Sb(III)) desencadeia apoptose relacionada a caspase e gera ROS através da alteração de níveis de GSH em células linfóides humanas (Leucureur et al. 2002). Entretanto, deve ser considerada a possibilidade ainda de elementos-traços contaminantes e citotóxicos dos antimoniais pentavalentes, como o arsênio, chumbo e Sb(III), contribuírem para a toxicidade desses medicamentos (Silva Junior, 2001; Romero et al. 2003; Dzamitika et al. 2006).

### **1.5- Interferência do ácido ascórbico nas ações farmacológicas de antimoniais e arsenicais trivalentes**

O ácido ascórbico (AA) ou vitamina C é um importante antioxidante e *scavenger* de radicais e vêm sendo utilizado no tratamento de câncer em associação com arsenicais e outros antimoniais (Cameron et al. 1979, Wenzel et al. 2004, Gonzales et al. 2005; Chen et al. 2005; Fromberg et al. 2011). Sohini e Rana (2007) observaram que o AA reduziu alterações no fígado e rim de ratos expostos a composto arsênico. Além disso, o AA demonstrou ação cardioprotetora em ratos Wistar, quando administrado concomitantemente ao arsenito de sódio (arsênio trivalente) ou tártaro emético (antimonial trivalente), ao reduzir as alterações provocadas por estes sobre a pressão arterial e ECG, parâmetros bioquímicos e histológicos (Gomes 2010). A utilização de AA reduziu o estresse oxidativo e nitrosativo em fígado de ratos submetidos a isquemia/reperfusão (Wang et al. 2009). Além disso, a associação de AA com composto arsênico aumentou a atividade antitumoral destes e reverte quadros de resistência a droga através da diminuição da concentração intracelular de GSH (Bahlis et al. 2002; Qazilbash et al. 2008). Segundo Qazilbash e colaboradores (2008), agentes como o ácido ascórbico que

---

depletam GSH potenciam a indução de apoptose por compostos metalóides. Dessa forma, quando administrado em altas doses, o AA exerce atividade prooxidante que é explorada no tratamento do câncer (Bahlis et al. 2002; Qazilbash et al. 2008, Chen et al. 2008; Bahlis et al. 2009).

Considerando que os antimoniais pentavalentes parecem exercer sua toxicidade através da sua redução ao Sb(III) e que estudos anteriores mostram que AA reduz os efeitos colaterais do antimônio na forma trivalente, hipotetizamos que a associação dos antimoniais pentavalentes com ácido ascórbico poderia reduzir sua toxicidade e modular sua eficácia no tratamento da leishmaniose.

## **1.6- Biodisponibilidade dos antimoniais pentavalentes por via oral e influência da forma farmacêutica**

Estudos farmacocinéticos de antimoniais pentavalentes foram realizados em pacientes com LV após administração intramuscular (Chulay et al. 1988). A farmacocinética plasmática se ajustou melhor com o modelo de três fases: uma primeira fase de absorção ( $T_{1/2}=0,85h$ ) seguida de fases de eliminação rápida ( $T_{1/2\alpha}=2h$ ) e lenta ( $T_{1/2\beta}=78h$ ). Aproximadamente 80 a 95% do antimônio foi encontrado na urina após 6 h, indicando uma rápida eliminação renal.

Estudos farmacocinéticos do antimoniato de meglumina foram também realizados em cães após administração endovenosa e oral (Valladares et al. 1996, Ribeiro et al. 2010). Após administração oral, observou-se uma rápida fase inicial de absorção com  $T_{1/2} = 0,23h$  seguida de uma fase de eliminação com  $T_{1/2} = 2,6h$ . Neste estudo, a biodisponibilidade de antimonial por via oral foi estimada em 10% (Ribeiro et al. 2010).

Para absorção de fármacos por via oral, propriedades físico-químicas da molécula, como lipofilicidade, tamanho, capacidade de ligação de hidrogênio e área superficial polar são importantes. Segundo Pang (2003), fármacos que são não ionizados exibem maior lipofilicidade com uma melhor permeação membranar que espécies iônicas. Até hoje, as vias de passagem transmembranar dos compostos antimoniais não foram elucidadas. Foi sugerido que Sb(V), ao contrário do Sb(III), não seria substrato das proteínas transportadoras do tipo MRP (Dzamtika et al.

2006) e, portanto, que a absorção intestinal não deveria ser influenciada por essa família de transportadores. Foi proposto ainda que a permeação dos complexos de Sb(V) ocorreria por difusão simples através da bicamada lipídica, o que explicaria sua baixa biodisponibilidade por via oral já que os antimoniais pentavalentes são moléculas hidrofílicas e ionizadas que se apresentam na forma de complexos de elevado peso molecular.

Apesar da biodisponibilidade oral relativamente baixa do antimoniato de meglumina, um estudo anterior demonstrou que a complexação deste fármaco com a ciclodextrina torna o antimonial ativo por via oral em modelo murino de LC (Demicheli et al. 2004). Entretanto, a baixa solubilidade em água do complexo antimonial/ciclodextrina limitou sua aplicabilidade em animais de grande porte (Ribeiro et al. 2010). Um novo processo de preparo do antimoniato de meglumina baseado em uma etapa de aquecimento seguida por liofilização foi também desenvolvido por nosso grupo (Martins et al. 2006, 2009) tornando o antimonial menos polimerizado e potencialmente mais biodisponível por via oral. Entretanto, essa nova forma do antimoniato de meglumina não foi avaliada em relação à sua eficácia em modelo de leishmaniose.

Os resultados obtidos até então, aliados à complexidade das estruturas dos antimoniais pentavalentes, apontam para a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a relação entre a estrutura destes fármacos, sua farmacocinética e eficácia por via oral.



## 2- Objetivos:

Com o intuito de estabelecer estratégias para reduzir a toxicidade dos antimoniais pentavalentes durante a quimioterapia das leishmanioses, propomos investigar a composição química do antimoniato de meglumina, o papel do Sb(III) residual na hepatotoxicidade e na eficácia do antimoniato de meglumina em modelo murino de leishmaniose visceral, o efeito do co-tratamento com ácido ascórbico e o benefício potencial da via de administração oral.

Para melhor compreensão deste trabalho, iremos subdividi-lo em três capítulos:

O primeiro capítulo visa a caracterização físico- química das formas sintética e comercial do antimoniato de meglumina, em relação à espécie molecular predominante e à presença dos metais-traços Sb(III), As e Pb.

No segundo capítulo, compararemos a hepatotoxicidade e eficácia dos compostos antimoniais em modelo murino de leishmaniose visceral e a influência do co-tratamento com ácido ascórbico.

No terceiro capítulo, avaliaremos o potencial da via de administração oral desses complexos antimoniais, através de estudos farmacocinéticos, de toxicidade e de eficácia em modelo murino de leishmaniose visceral.

Capítulo 1: Caracterização físico-química das  
formas sintética e comercial do antimoniato de  
meglumina

---

## 3- Capítulo 1: Caracterização físico-química das formas sintética e comercial do antimoniato de meglumina

### 3.1- Introdução

Demicheli e colaboradores, em 2003, obtiveram grande êxito propondo duas novas rotas sintéticas para o antimoniato de meglumina utilizando como fonte de Sb pentavalente o pentacloreto de antimônio ( $\text{SbCl}_5$ ) que gerou o composto que denominamos AM (Patente concedida no Brasil PI 9907575-0, 1999) e outra utilizando hexahidroxiantimonato de potássio ( $\text{KSb(OH)}_6$ ) que deu origem ao composto que denominamos AM1 (Patente concedida no Brasil PI 0106305-7, 2001). Tais compostos quando analisados por espectrometria de massas (ESI-MS) mostraram espécies moleculares semelhantes àquelas encontradas no produto comercial (Demicheli et al. 2003), ou seja, uma mistura de oligômeros com fórmula geral  $(\text{meglumina-Sb})_n$ -meglumina e  $(\text{meglumina-Sb})_n$ .

Neste capítulo, propomos avançar na caracterização físico-química desses complexos e do produto comercial, através da identificação da espécie molecular predominante, a determinação do Sb(III) residual e de outros elementos-traços potencialmente tóxicos. Estes conhecimentos se tornam importantes para explicar possíveis diferenças na farmacocinética, eficácia e toxicidade entre os compostos.

### 3.2- Material e métodos

#### 3.2.1- Preparação dos compostos antimoniais

O antimoniato de meglumina foi sintetizado como previamente descrito (Demicheli et al. 2003) a partir de quantidades equimolares de *N*-metil-D-glucamina e oxihidrato de antimônio pentavalente cuja fonte de antimônio foi  $\text{SbCl}_5$  para o AM e  $\text{KSb(OH)}_6$  para o AM1. Após a síntese, os compostos foram dissolvidos em água na concentração de 0,7 M de Sb, as formulações foram submetidas ao aquecimento por 3 horas a 60°C sob agitação e finalmente liofilizados (adaptado Martins et al. 2006). A amostra comercial de Glucantime<sup>®</sup> foi gentilmente doada pelo Instituto Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou Belo Horizonte (CPqRR).

---

### 3.2.2- Determinação de osmolaridade

Soluções de antimoniais foram preparadas em água a 0,1 M de Sb e a medida de osmolaridade foi realizada a 25°C através do equipamento Vapor Pressure Osmometer, Vapro5520 – Wescor<sup>®</sup>, Logan (Utah, USA) (n=3).

### 3.2.3- Permeação através de membrana de celulose

Amostras de antimoniais (0,7 M de Sb) foram submetidas ao processo de ultrafiltração usando membrana de celulose regenerada de ultrafiltração Amicon Ultra<sup>®</sup> MWCO de 3000 daltons, através da centrifugação a 14000 x g durante 15 minutos a 25°C. A quantidade de Sb contida no ultrafiltrado e a contida na solução original foram quantificadas por espectroscopia de absorção atômica em forno grafite (ETAAS) usando o espectrômetro AA600 da Perkin-Elmer. A porcentagem de Sb que atravessou a membrana foi calculada. Este ensaio foi repetido com 5 amostras independentes para cada composto antimonial.

### 3.2.4- Determinação de Sb(III) residual

#### 3.2.4.1- Determinação fotométrica

Para determinar a quantidade de Sb(III) residual dos compostos estudados, utilizou-se a técnica descrita por Frezard et al. 2001, baseada na interação específica de Sb(III) com vermelho de bromopirrogaloil (BPR). A absorbância de BPR a 560 nm diminui proporcionalmente a quantidade de Sb(III) na amostra analisada como consequência da formação do complexo BPR:Sb(III) (1:1). A solução de cromógeno (0,5 mL) foi preparada pela mistura de 0,1 mL em 0,1 M de fosfato, 0,01 mL de tartarato 5% (p/v), 0,05 mL de solução BPR a 350  $\mu$ M em etanol/água (1:1 v/v) e 0,34 mL de água. O pH foi ajustado para 6,8. A absorbância foi registrada antes ( $A_o$ ) e após ( $A_m$ ) adição de 15  $\mu$ L de amostra a 2 mL de solução de cromógeno. A curva de calibração é estabelecida utilizando tartarato de antimônio(III) potássio como fonte de Sb(III) e a diferença de absorbância de BPR ( $A_o - A_m$ ) é plotada em função da concentração de Sb(III).

---

### 3.2.4.2- Determinação de Sb(III) por voltametria

A determinação de Sb(III) nos compostos AM1 e Glucantime<sup>®</sup> foi realizada de acordo com o método descrito por Salaun e Frezard (2013) baseado na técnica de voltametria de redissolução anódica de um eletrodo de filamento de ouro. A técnica de detecção foi baseada na onda quadrada em 1 mM HCl utilizando um potencial de depósito de -0,6 V (Ag/AgCl/KCl (3 M)). Anteriormente a análise, a solução de Glucantime foi diluída em condições alcalinas (10 mM NaOH) para evitar perda de Sb(III). Glucantime<sup>®</sup> foi diluído 10<sup>7</sup> vezes. AM1 foi primeiramente dissolvido em 10 mM de NaOH para obter uma solução de 6,1 µg/mL antes do início da análise, a amostra sofreu diluição de 500 vezes na célula voltamétrica. Em ambos os casos (AM1 e Glucantime<sup>®</sup>), a determinação foi feita pelo método de adição de padrões em tampão acetato, pH 4,43 ajustado com HClO<sub>4</sub>.

### 3.2.5- Determinação de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e metais-traços potencialmente tóxicos

A determinação de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e elementos-traços (Ba, As, Pb e Cu) foi realizada na Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC/MG) sob a supervisão da Dra. Olguita Geralda Ferreira Rocha.

A quantificação de Na<sup>+</sup>, Ba<sup>++</sup> e K<sup>+</sup> foi realizada através de Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido (ICP-OES) e a quantificação dos metais-traços arsênio e chumbo foi determinada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

A quantificação de Cl<sup>-</sup> foi realizada pela central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo por espectrometria de absorção atômica com plasma induzido (ICP-AES).

### 3.2.6- Análise elementar de Carbono

A análise elementar de carbono foi realizada pela central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo por espectrometria de absorção atômica com plasma induzido (ICP-AES).

---

### **3.2.7-Cinética de redução de Sb(V) pela cisteína**

A fim de determinar a redução de Sb(V) pela cisteína (Cys), utilizamos um meio reacional que consistiu de 10 mM de Cys, 0,1 M de KCl, 0,02 M de fosfato e 0,02 M de acetato de acordo com Oliveira et al. 2006. O pH foi ajustado para 5 e após o preparo da amostra, as soluções foram mantidas em atmosfera de argônio para prevenir a oxidação de cisteína pelo oxigênio. No tempo zero, o composto antimônio foi adicionado na concentração final de 2 mM de Sb e as amostras foram incubadas a 37° C. A taxa de redução do Sb(V) foi determinada fotometricamente como descrito anteriormente no item 3.2.4.1, explorando a interação específica de Sb(III) com BPR. Os tempos analisados foram 30 min, 1h, 1,4 h, 2h, 3h, 5 h e 9 h. As análises foram realizadas em triplicata.

## **3.3- Resultados e discussão**

### **3.3.1-Identificação da espécie predominante presente no antimoniato de meglumina**

O grau de polimerização e o estado de ionização dos compostos sintéticos e comercial foram investigados com o intuito de identificar a espécie predominante e possíveis diferenças entre os compostos sintéticos (AM e AM1) e comercial (Gluc).

Para avaliar esses parâmetros físico-químicos do antimoniato de meglumina, foi determinada a osmolaridade de soluções dos compostos antimoniais em água e foram realizadas análises elementar de carbono, cloreto, sódio, potássio e antimônio dos produtos liofilizados.

Os resultados da osmolaridade obtidos a partir de soluções aquosas de AM, Gluc e AM1 na concentração molar de Sb 0,1 M são mostrados na Figura 5, onde podemos observar valores de osmolaridade significativamente menores para Gluc sugerindo espécies mais polimerizadas no composto comercial.

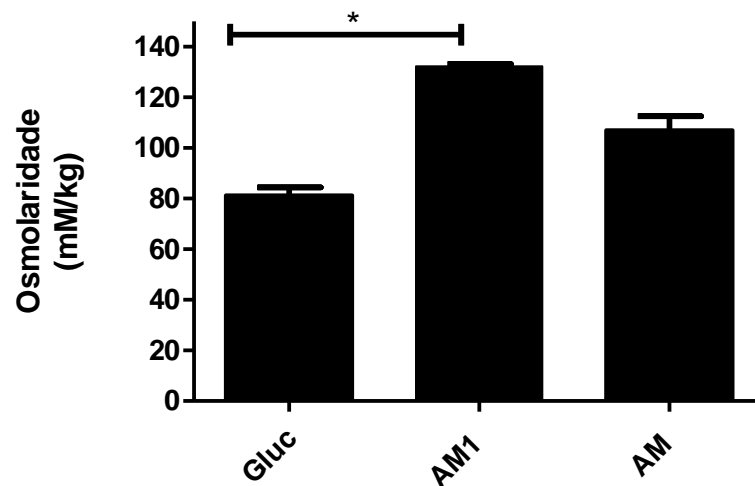


Figura 5: Osmolaridade das soluções aquosas de AM, AM1 e Gluc a 25°C e 0,1 M de Sb. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  EP. Análise com One-Way ANOVA com pós-teste de Dunn's, \*  $p < 0,05$ . (n=3).

Os resultados das análises elementares são apresentados na Tabela 1. A partir desses dados, foi possível recalculer o valor de osmolaridade e das concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e Sb dos diferentes compostos na concentração de 300 mg/L (Tabela 2), que corresponde à concentração da solução do produto comercial.

Tabela 1: Resultados da análise elementar de C,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  e Sb em formas sintéticas (AM e AM1) e comercial (Gluc) do antimoniato de meglumina liofilizadas

Compostos	Na (%) <sup>a</sup>	Cl (%) <sup>b</sup>	K (%) <sup>a</sup>	Sb (%) <sup>a</sup>	C (%) <sup>b</sup>
AM	0,0039	2,455	2,1189	31,46	21,42
AM1	0,0162	3,53	3,0947	31,16	20,32
Gluc	0,2095	3,56	0,2495	28,03	24,42

<sup>a</sup>- quantificação por ICP OES <sup>b</sup>-quantificação por ICP AES

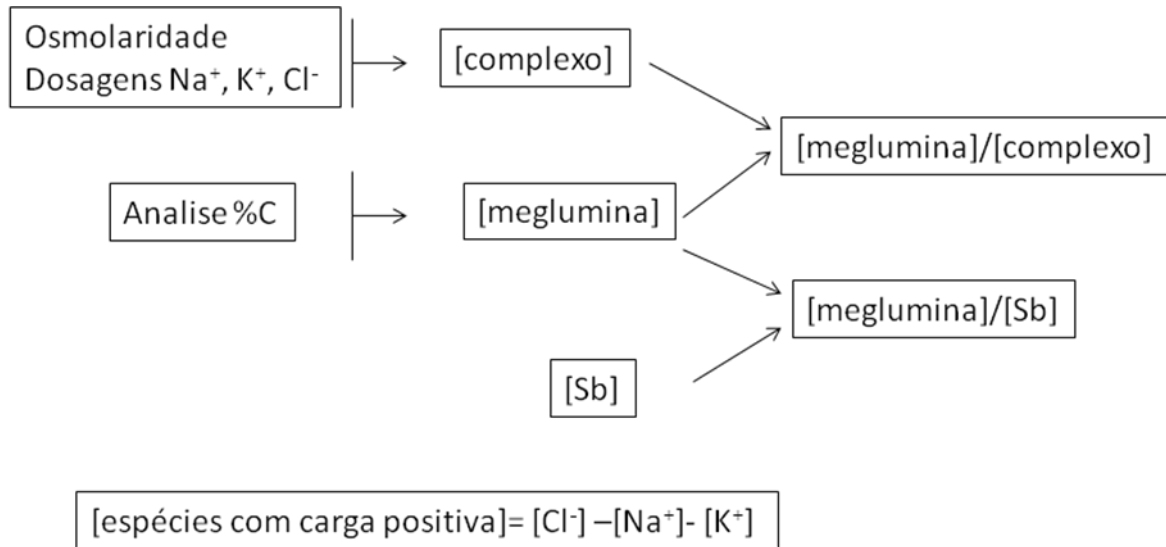


Figura 6: Parâmetros calculados a partir da quantificação de osmolaridade, concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e Sb.

Como ilustrado na Figura 6 e mostrado nas Tabelas 1 e 2, foi possível determinar parâmetros importantes como as relações molares  $[\text{meglumina}]/[\text{complexo}]$  e  $[\text{meglumina}]/[\text{Sb}]$ , bem como a concentração molar de espécies com carga positiva.

Tabela 2: Valores de osmolaridade e de concentração de meglumina,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ , Sb calculados para o antimoniato de meglumina na concentração de 300 mg/mL

Composto	Osmolaridade a 25°C (mOsm/kg)	[Na] (mM) <sup>a</sup>	[Cl] (mM)	[K] (mM) <sup>a</sup>	[Sb] (mM) <sup>a</sup>	[meglumina] (mM) <sup>b</sup>	[complexo] (mM) <sup>c</sup>	Razão [meglumina]/[Sb]	Razão [meglumina]/[complexo]	[Carga positiva] no complexo (mM) <sup>d</sup>
AM	749	0,51	208	163	775	764,6	377	0,986	2,0	44,5
AM1	926	2,11	299	237	768	725,5	388	0,944	1,9	59,9
Gluc	616,9	27,3	291	19	685	881,1	280	1,285	3,1	244,5

<sup>a</sup>- determinada por ICPOES; <sup>b</sup>- calculada a partir da análise elementar (%C);

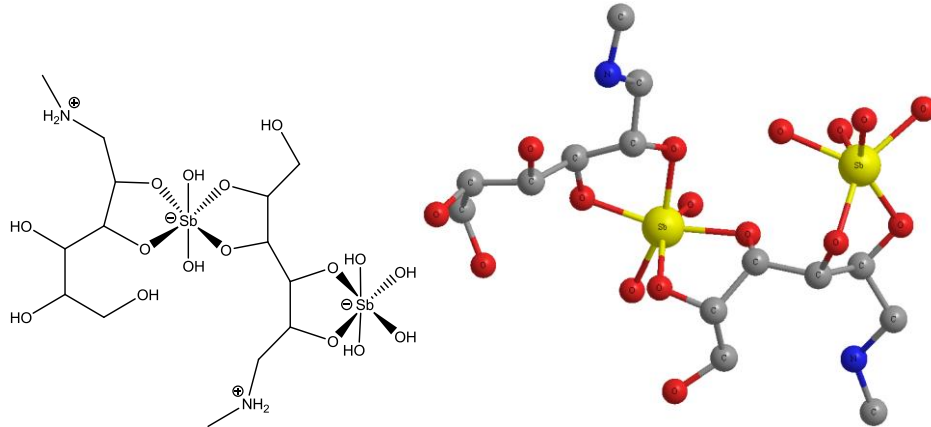


---

<sup>c</sup>- [complexo] = osmolaridade – [Na<sup>+</sup>] – [K<sup>+</sup>] – [Cl<sup>-</sup>]; <sup>d</sup>- [espécie com carga positiva] = [Cl<sup>-</sup>] - [Na<sup>+</sup>] - [K<sup>+</sup>]

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 2, a espécie predominante no AM e AM1 é um complexo essencialmente zwitteriônicos de estequiometria Sb-meglumina 2:2, enquanto aquela encontrada no Gluc é um complexo Sb-meglumina de estequiometria 2:3 de carga efetiva positiva. As estruturas dos compostos são mostradas na Figura 7.

## AM ou AM1 (bastão e esfera)



## Gluc (bastão e esfera)

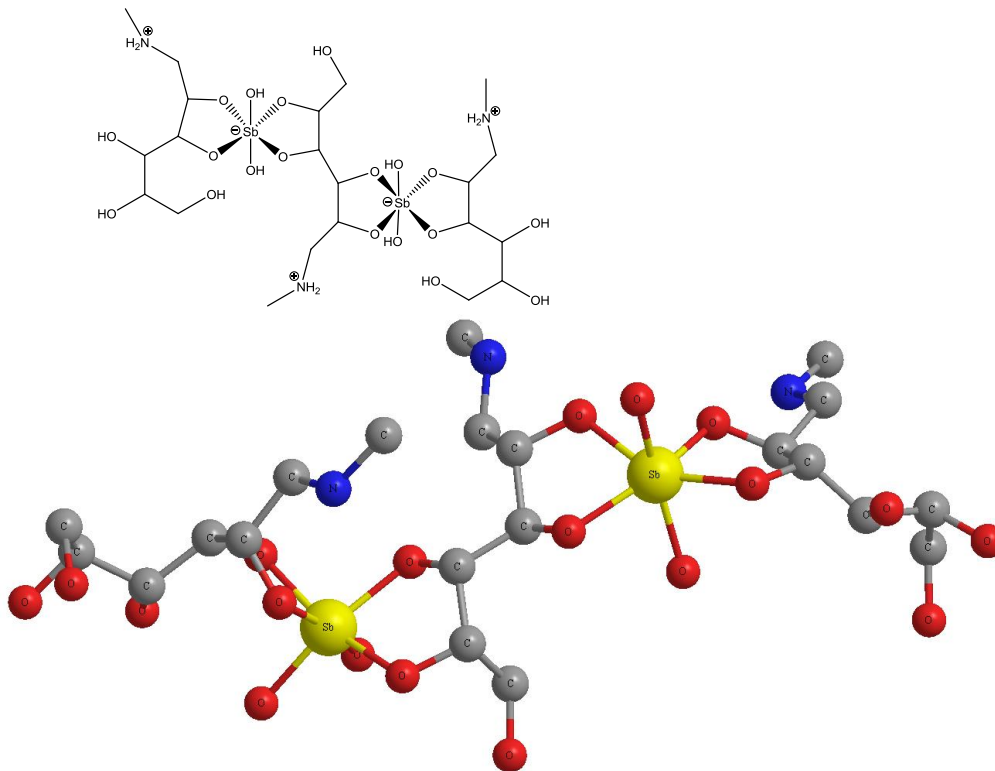


Figura 7: Espécies predominantes identificadas no antimoniato de meglumina sintético e comercial (Representações hipotéticas em esfera e bastão fornecidas pelo programa Chemdraw a partir dos dados obtidos).

### 3.3.2- Permeação através de membrana de celulose

Comparamos a eficiência de permeação do Sb a partir dos três compostos antimoniais através de membrana de celulose regenerada de MWCO 3000 daltons a fim de verificar possível diferença de permeação entre os compostos, no qual Gluc apresentou a menor eficiência de permeação (Figura 8).

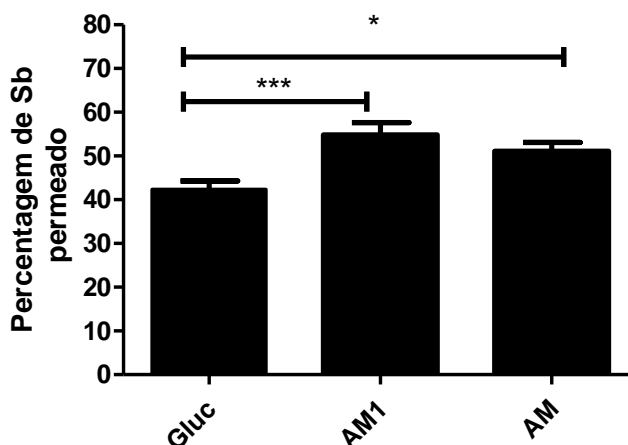


Figura 8: Percentagem de Sb permeado através da membrana de celulose MWCO de 3000 daltons. Os dados são mostrados como média  $\pm$  EP. (n=5). \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ . Análise com One-Way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

### 3.3.3- Estudo de redução de Sb(V) a Sb(III) pela cisteína

Comparamos a reatividade dos antimoniais pentavalentes quanto a sua capacidade de redução de Sb(V) a Sb(III) pela cisteína, um importante tiol dos lisossomas (Ferreira et al. 2003), para avaliar possível influência da estrutura do complexo na susceptibilidade de Sb(V) à redução.

A Figura 9 mostra as cinéticas de redução a 37°C para os diferentes compostos antimoniais. AM e AM1 apresentaram cinéticas idênticas que foram significativamente mais rápidas que no Gluc.

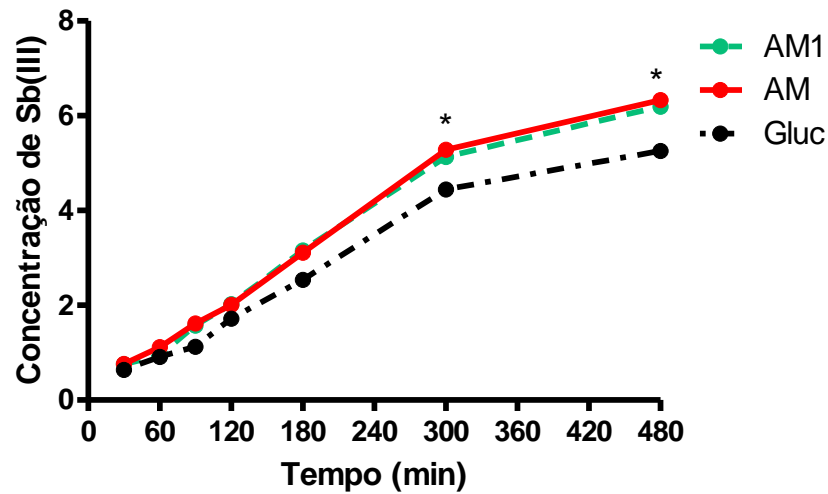


Figura 9: Cinéticas de redução pela cisteína do Sb(V) a Sb(III) nos antimoniais pentavalentes AM, AM1 e Gluc a 37°C. Os dados são mostrados com médias  $\pm$  EP (n=3) \* $p < 0,05$  e \* = diferença significativa em relação ao grupo Gluc. Análise com One Way ANOVA com pós teste Bonferroni.

### 3.3.4- Doseamento de Sb(III) residual

O Sb(III) residual foi determinado por dois diferentes métodos: um método voltamétrico recentemente descrito (Salaun e Frezard, 2013) e por método fotométrico baseado na interação específica do Sb(III) com o cromógeno BPR (Rath et al. 1997). Apesar de Gluc e AM1 apresentarem similares teores de Sb (30%, p/p), Gluc mostrou maior conteúdo de Sb(III) quando comparado ao AM1 nos dois métodos. O método voltamétrico detectou no Gluc e AM1,  $24,1 \pm 0,4\%$  e  $16,3 \pm 0,7\%$  de Sb(III), respectivamente em relação ao conteúdo de Sb total (Fig. 10). Já o método fotométrico mostrou uma proporção de  $0,068 \pm 0,002\%$  para Gluc e níveis não detectáveis para AM1 (proporção  $< 0,007\%$ ).

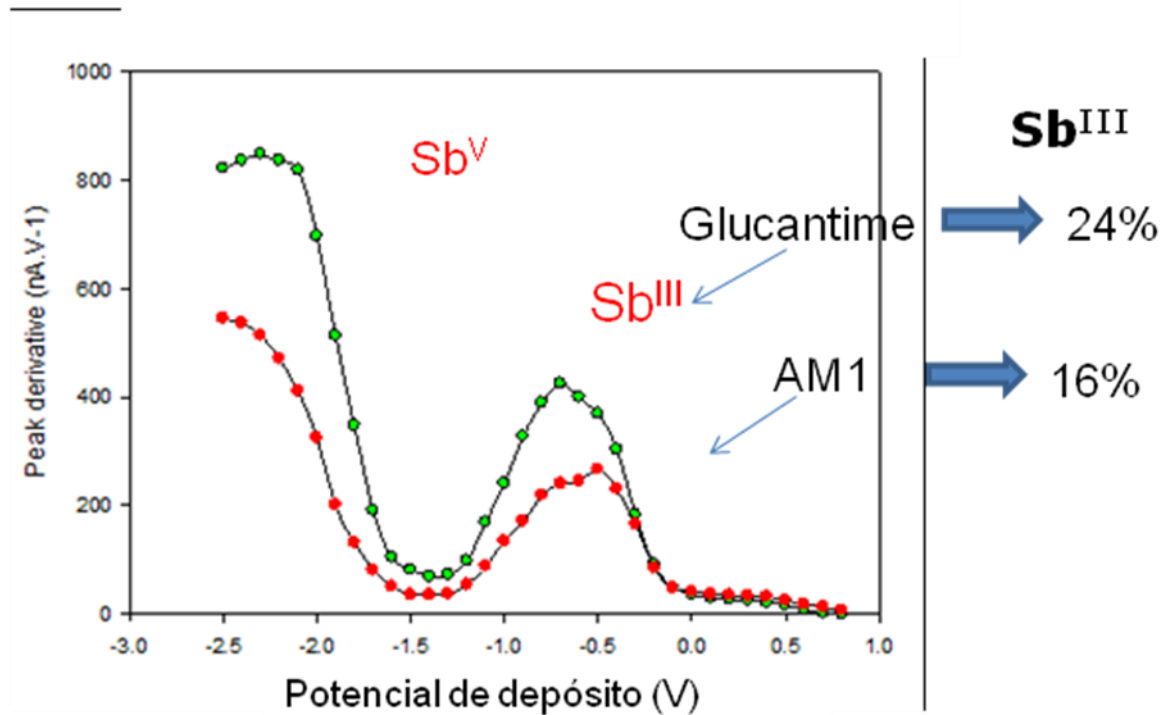


Figura 10: Curvas de pseudo polarografia obtidas para os compostos AM1 e Glucantime<sup>®</sup> pela técnica de voltametria de redissolução anódica com eletrodo de ouro (Salaun e Frezard 2013). Duas ondas são observadas: a primeira relaciona-se à redução do Sb(V); a segunda é devido à redução de Sb(III) e permite a determinação de Sb(III).

### 3.3.5- Determinação de metais – traços

Visando identificar metais-traços potencialmente tóxicos nos compostos AM, AM1 e Gluc, determinamos as concentrações de As, Pb, Ba e Cu (Tabela 3). Para maiores detalhes ver item 3.2.5.

Tabela 3: Concentração dos metais-traços nos compostos antimoniais AM, AM1 e Gluc

Composto	Concentração de As( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>c</sup>	Concentração de Pb ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>a</sup>	Concentração de Ba ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>a</sup>	Concentração de Cu( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>b</sup>
AM	222,3	91,8	0,36	5,80
AM1	< 1,5	< 2,5	0,48	<1,5
Gluc	< 1,5	< 2,5	2,76	1,56

Determinação por: <sup>a</sup> - ETAAS; <sup>b</sup> - ICP- OES; <sup>c</sup> - ICP- MS

Segundo o Centers for Disease Prevention and Control/CDC, os valores de referência para As =0,0003 mg/kg/dia; para Pb= 0,007 mg/kg/dia; para o Ba= 2 mg/kg/dia e para o Cu < 0,0182 mg/kg/dia. Cálculo estimado para um paciente de 60kg, com dosagem de 20mg/SbV/ kg/dia (14mL/dia, por via parenteral, conforme a dosagem preconizada para tratamento das leishmanioses. Segundo Silva Junior 2001.

Pode-se observar níveis elevados de As e Pb acima do limite de detecção dos métodos apenas no composto AM.

### 3.4- Discussão

De acordo com os resultados obtidos, a espécie predominante no AM e AM1 é um complexo zwitteriônico de estequiometria Sb-meglumina 2:2, enquanto aquela encontrada no Gluc é um complexo Sb-meglumina de estequiometria 2:3 de carga efetiva positiva. Vale ressaltar que é a primeira vez que se determina a espécie molecular predominante no Gluc. Uma explicação possível para a diferença da estrutura entre os compostos antimoniais é o fato da síntese de Gluc, ao contrário do

---

AM e AM1, não usar uma relação molar Sb:meglumina 1:1, mas sim um leve excesso de ligante com relação ao metal.

A diferença de estrutura entre os compostos sintéticos e o comercial permite explicar sua diferença de permeação através de membrana sintética, onde Gluc apresentou menor taxa de permeação quando comparado ao AM1 e AM. Uma possível explicação para este resultado poderia ser o maior peso molecular do complexo predominante no Gluc quando comparado àquele identificado no AM e AM1. Esse resultado sugere uma possível diferença entre esses compostos no coeficiente de permeabilidade através de membranas biológicas, o que será estudado no terceiro capítulo.

Uma outra diferença observada entre o composto comercial e os compostos sintéticos é a cinética de redução mais rápida do Sb(V) pela cisteína no Gluc quando comparado ao AM e AM1. Ferreira e colaboradores (2003) sugeriram que a lenta taxa de redução do Sb(V) por tióis na forma de antimoniato de meglumina poderia ser atribuída à capacidade do ligante meglumina estar protegendo o Sb(V) da redução neste complexo. Assim, a menor reatividade do Gluc pode ser explicada pela menor acessibilidade do Sb no complexo Sb-meglumina 2:3 no Gluc, quando comparado ao complexo 2:2 no AM e AM1. A menor susceptibilidade do Gluc à redução pela cisteína poderia ter implicações farmacológicas, uma vez que a redução de Sb(V) a Sb(III) é considerado uma etapa importante de ativação dos compostos antimoniais pentavalentes (Frezard et al. 2009).

A diferença de estrutura, de permeabilidade e de reatividade dos compostos sintéticos e comercial permite antecipar diferença de farmacocinética, de biodisponibilidade, de toxicidade e eficácia desses compostos.

Considerando a nota técnica sobre o antimoniato de meglumina de Silva Junior (2001) que relata teor limite de metal pesado para As de 0,0003 mg/kg/dia e para o Pb de 0,007 mg/kg/dia em humanos, observamos que o AM apresenta teor 5 vezes maior para As e teor de Pb próximo ao valor permitido.

Um outro resultado importante e surpreendente deste capítulo é o elevado teor de Sb(III) detectado nos compostos antimoniais pentavalentes, o que sugere um possível papel do Sb(III) residual seja na toxicidade, seja na atividade dos compostos antimoniais. É interessante ressaltar que o Gluc, apesar de não

---

apresentar teores de As e Pb que ultrapassem o limite permitido, apresenta teor elevado de Sb(III).

A discrepância entre as concentrações de Sb(III) encontradas pelos diferentes métodos analíticos pode ser explicada pela provável combinação de diversos fatores experimentais/químicos que promovem uma complexação relativamente forte entre Sb(III) e a matriz do antimoniato de meglumina no ensaio fotométrico, comparado ao ensaio de voltametria: valor elevado de pH (pH 6,8 vs 3,2 para ensaio voltamétrico), fator de diluição muito menor para o ensaio com BPR ( $10^2$  vs  $10^7$ ) e força iônica elevada (20 vs 1 mM). Estes parâmetros (pH, fator de diluição e força iônica) mostraram uma importante influência nos níveis de Sb(III) determinados no Gluc (Salaun e Frezard 2013). Neste estudo prévio, a quantidade de Sb(III) detectada mostrou uma diminuição marcante com aumento de pH, presumidamente devido à mudança induzida pelo pH no equilíbrio químico de complexos de antimônio em solução. Além disso, mesmo com a diluição das amostras acima de  $10^8$  vezes em pH neutro ( $\sim 6$ ), o Sb(III) ainda estava presente na forma de um complexo, evidenciando uma constante de complexação forte entre Sb(III) a meglumina ou antimoniato de meglumina (Salaun e Frezard 2013).

O método de BPR é baseado na competição da ligação do Sb(III) entre o BPR e o ligante (meglumina ou antimoniato de meglumina). Interpretamos as concentrações muito menores de Sb(III) encontradas por este método, pelo valor de pH relativamente alto (6,8) e o baixo fator de diluição, o que favorece uma alta complexação de Sb(III) com o ligante meglumina/antimoniato de meglumina e conseqüentemente diminui a quantidade de complexos Sb(III)-BPR.

O fato da quantidade de Sb(III) detectada pelo método fotométrico ser pelo menos 7,5 vezes maior em Gluc que em AM1 e apenas 1,5 vezes maior por voltametria, indica que o pH e diluição do ensaio fotométrico promove a liberação do Sb(III) de forma mais efetiva no Gluc que no AM1. Isso sugere que o Sb(III) está mais disponível a partir de Gluc que de AM1 em pH neutro. Uma possível explicação para esta alta afinidade de ligação do Sb(III) no AM1 poderia ser o maior número de sítio de ligação no AM1 quando comparado ao Gluc.

O menor teor de Sb(III) no AM1 pode ser explicado pela rota de síntese utilizada que difere daquela do AM e Gluc, com relação ao uso do  $\text{KSb(OH)}_6$  como



---

fonte de antimônio pentavalente. Acreditamos ainda que o Sb(III) residual encontrado nos antimoniais pentavalentes seja proveniente de uma reação de redução de Sb(V) a Sb(III), que poderia ocorrer concomitantemente à reação de complexação do Sb(V) a meglumina. Por outro lado, os resíduos de As e Pb encontrados no AM poderiam ser provenientes da matéria-prima ( $\text{SbCl}_5$ ) utilizado na síntese deste composto.

### 3.5- Conclusões do capítulo

Mostramos pela primeira vez que AM1 e AM consistem predominantemente de complexo com estequiometria Sb- meglumina 2:2 essencialmente zwitteriônico, enquanto Gluc foi caracterizado como um complexo de estequiometria Sb- meglumina 2:3 com carga efetiva positiva.

Gluc apresentou uma menor taxa de permeação através da membrana sintética com MWCO 3000 Da e uma menor susceptibilidade à redução pela cisteína, quando comparado ao AM e AM1.

AM apresentou quantidade residual significativas de Pb e As ao contrário dos demais compostos analisados.

A especiação do antimônio usando método voltamétrico mostrou elevado teor de Sb(III) no Gluc correspondendo a 24% do Sb total, e um teor de 1,5 vezes menor no AM1.

A especiação usando o método fotométrico mostrou teores muito menores de Sb(III) seguindo a ordem AM > Gluc > AM1.

Capítulo 2: Hepatotoxicidade dos antimoniais pentavalentes: possível papel do Sb(III) e influência da associação com ácido ascórbico

---

## **4 Capítulo 2: Hepatotoxicidade dos antimoniais pentavalentes: possível papel do Sb(III) e influência da associação com ácido ascórbico**

### **4.1- Introdução**

É geralmente aceito que o antimoniato de meglumina seja um pró-fármaco que sofra redução de Sb(V) à Sb(III), que seria a forma ativa desse fármaco. O Sb(III) interfere no metabolismo dos tíois e gera estresse oxidativo tanto no parasito quanto em células mamíferas (Wyllie et al. 2006). Os antimoniais podem ainda induzir produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) pelos macrófagos murinos, contribuindo com a eliminação do parasito mas podendo causar injúrias ou morte celular em células mamíferas (Haldar et al. 2011).

Por outro lado, os compostos antimoniais pentavalentes podem apresentar teor de Sb(III) não desprezível (Salaun e Frezard, 2013). Assim, levantamos a hipótese que o Sb(III) residual poderia ter um papel na toxicidade dos fármacos. Dessa forma, propomos explorar a diferença de teor de Sb(III) residual entre os compostos sintético e comercial como evidenciado na primeira parte desta tese, para investigar a influência do Sb(III) residual na toxicidade e eficácia do antimoniato de meglumina em modelo murino de leishmaniose visceral.

Considerando ainda os relatos na literatura sobre a redução da toxicidade de compostos metalóides (antimoniais ou arsenicais) no estado de oxidação trivalente, quando associados ao ácido ascórbico (AA) (Wenzel et al. 2004, Sohini e Rana, 2007; Singh e Rana, 2007; Gomes 2010), propomos investigar o efeito do co-tratamento com o antioxidante AA como estratégia para reduzir os efeitos colaterais do tratamento com antimonial pentavalente.

### **4.2- Material e Métodos**

#### **4.2.1- Avaliação da incorporação intracelular de antimônio em macrófagos peritoneais**

Os macrófagos foram isolados de camundongos *Swiss* (provenientes do CEBIO, ICB/UFMG) após injeção intraperitoneal de tioglicolato por lavagem peritoneal com solução PBS gelado. As células foram lavadas, contadas e uma

---

suspensão resultante de densidade de  $1 \times 10^6$  células por tubo (1 mL) foi obtida. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (suplementada com 10% soro fetal bovino, estreptomicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e penicilina (1000 U/mL)) a 37°C em atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$  por 4 horas na presença de Gluc, AM e AM1 na concentração 0,8 mM de Sb. Após incubação, a suspensão de células foi lavada três vezes com PBS (2000 x g por 10 minutos a 4°C) e por fim foi removido o sobrenadante (Marques-da Silva et al. 2011). Ao “*pellet*” resultante, foi adicionado ácido nítrico concentrado (65%). As amostras foram incubadas “*overnight*” à temperatura ambiente, diluídas 100x em ácido nítrico 0,2% e submetidas à dosagem de antimônio por espectrofotometria de absorção atômica em forno grafite usando espectrômetro AA600 da Perkin Elmer (protocolo Cetea 199/11).

## **4.2.2- Estudo de eficácia e toxicidade em modelo murino de leishmaniose visceral**

### **4.2.2.1- Infecção, tratamento e avaliação da eficácia**

Este estudo foi realizado no CPqRR/Fiocruz sobre a supervisão da Dra. Ana Rabello. O esquema do tratamento e os testes realizados estão ilustrados na Figura 11. Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas com idade de 4-8 semanas provenientes do Biotério do CPqRR. Os animais receberam o inóculo de  $2 \times 10^7/200\mu\text{L}$  promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/70/BH-46), por via endovenosa na veia lateral da cauda (8º dia da cultura de crescimento). O tratamento foi iniciado 7 dias após infecção na dose de 80 mg de Sb(V)/kg/dia por 20 dias por via intraperitoneal (IP). Os animais (n=6/grupo) receberam AM, AM1 ou Glucantime® (Gluc) em associação ou não com 15 mg/kg/dia de AA também por via IP. O AA foi administrado 15 minutos antes da administração do antimonial. Os grupos controle negativos receberam apenas solução salina ou salina e AA (15 mg/kg/dia). A eutanásia ocorreu 30 dias pós-infecção em câmara de  $\text{CO}_2$ , ou seja, 3 dias após a última dose administrada. O sangue foi retirado pela artéria braquial para dosagens bioquímicas realizadas pelo laboratório TECSA. Os testes bioquímicos envolvem: dosagens das enzimas aspartato alanintransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina. O fígado e baço de cada

---

animal foram coletados e pesados para determinação da carga parasitária através da técnica de diluição limitante (Titus et al 1985, Sampaio et al. 2003). Cada fígado e baço infectado foi assepticamente homogeneizado para obter 1 mL de meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 mL de penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 mg/mL a pH 7,0. Cada homogenato foi submetido à diluição sequencial de 10 vezes em placa de 96 poços, em triplicata e incubados a 26°C por 10 dias. Os poços foram examinados utilizando microscópio invertido (Axiovert 25; Zeiss) e a carga parasitária foi determinada a partir da maior diluição dos poços (n=3) em que se encontrou promastigotas móveis como carga parasitária =  $10^{\text{maior diluição}}$ . Os dados obtidos foram expressos como carga parasitária/mg do órgão.

Durante os experimentos foram observados diariamente os seguintes sinais indicativos de sofrimento e dor: perda de peso, ereção do pêlo e postura alterada, isolamento, vocalização ao ser manipulado. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com regulamentação local e o protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Fiocruz (protocolo P-0321/06, licença L-0024/8).

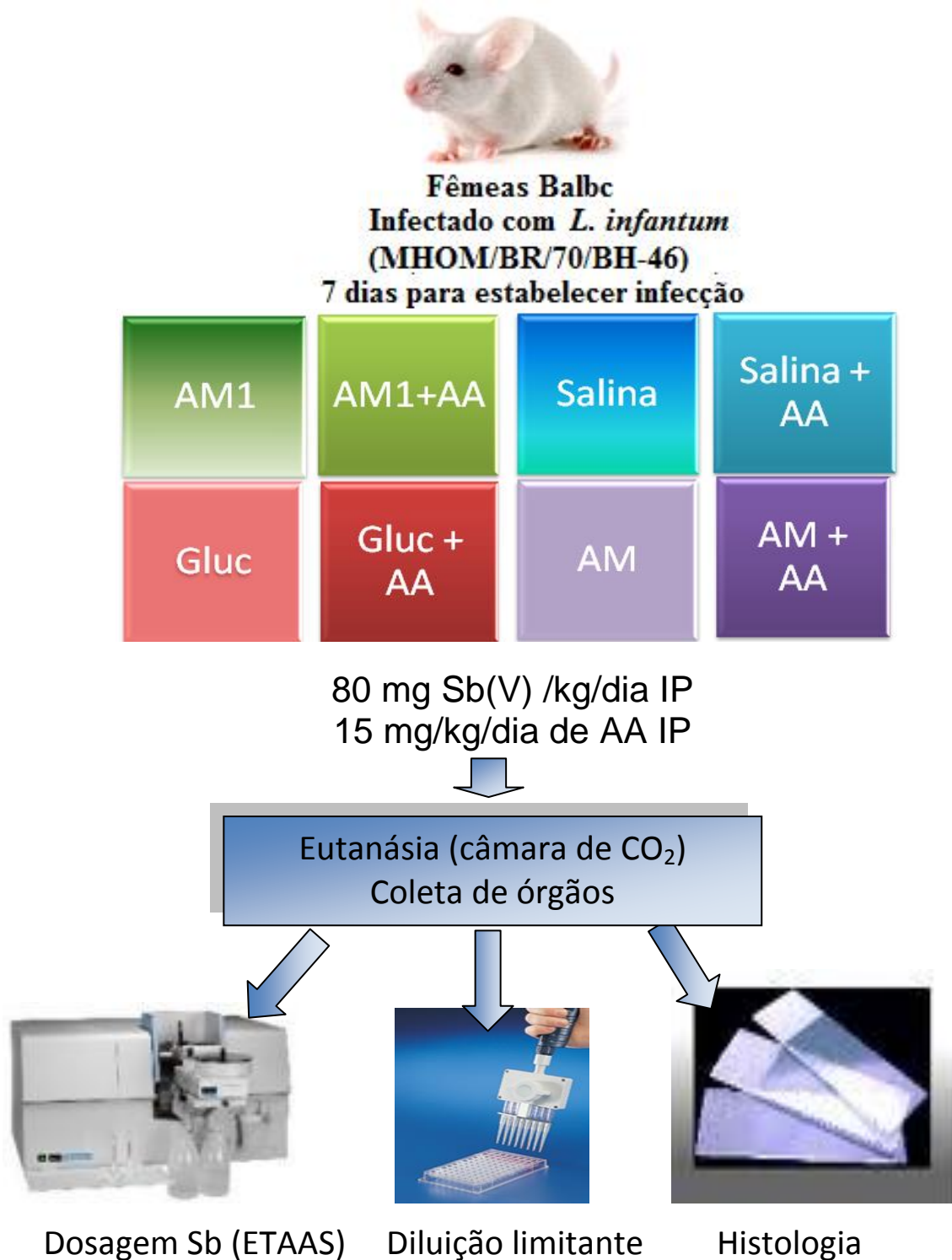


Figura 11: Ilustração dos ensaios *in vivo* do tratamento com antimoniais em associação ou não com ácido ascórbico em camundongos fêmeas Balb/c infectados

---

experimentalmente com *Leishmania infantum*. Ver item 4.2.2.1, 4.2.2.2, 4.2.2.3 para mais detalhes.

#### **4.2.2.2- Concentração hepática de Sb**

A concentração de antimônio foi determinada no fígado dos animais utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite usando espectrômetro AA600 (ETAAS) da Perkin-Elmer de acordo com Schettini et al. 2006. O tecido hepático foi homogeneizado com dois terços de sua massa em PBS. Após a homogeneização, 200 mg do homogenato foi pesado e submetido à digestão com 1mL de ácido nítrico a 65% por 45 minutos a 90° C em bloco digestor (Dry block modelo 4004 Marconi®). Em seguida, adicionou-se 450 µl de peróxido de hidrogênio a 30% e manteve-se sob aquecimento a 90° C por 30 minutos. Após resfriamento, as amostras foram ressuspensas em ácido nítrico 0,2% em balão volumétrico até o volume final de 5 mL. Após digestão, a determinação de Sb é realizada através de ETAAS. A quantidade de Sb por massa do fígado foi calculada utilizando a massa inicial da amostra digerida antes da digestão. O método analítico foi previamente validado mostrando o limite de quantificação de 0,93 µg de Sb por grama de órgão (Fernandes et al. 2013).

#### **4.2.2.3- Análises histológicas**

Fragmentos de fígado, baço, rins, pâncreas e coração de cada animal foram fixados em formol tamponado 10% por imersão. Após 24 horas, os fragmentos foram inseridos em álcool 70%, desidratado em soluções crescentes de álcool até etanol puro. Diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Os tecidos foram seccionados em 6 µm utilizando micrótomo MICRON e colocados sob lâminas que foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para estudo geral de histologia (Figura 12) (Luna 1968).

Realizamos a determinação mínima de 15 campos independentes por lâmina de cada órgão de animal analisado. Para a captação de imagens, utilizamos o microscópio de luz Olympus BX 41 e o programa Image Pro-Plus. As imagens digitalizadas foram obtidas através da câmera digital (Q-Color; Olympus) acoplada ao microscópio Olympus BX41.

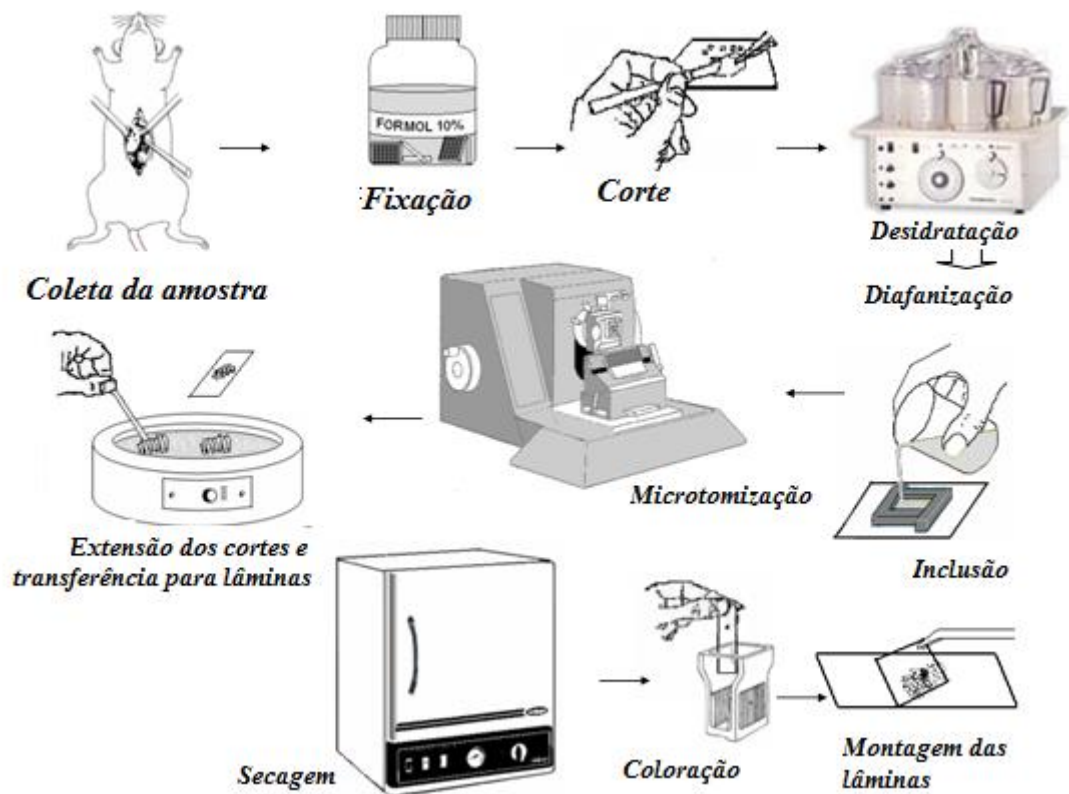


Figura 12: Esquema do processamento de rotina para histologia.

A atividade peroxidase foi avaliada como marcador de estresse oxidativo através da técnica de marcação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (adaptado de Angermuller e Fahimi e 1983, Fahimi 2009). Dez campos de cada lâmina foram analisados com objetiva de 60x e 10x para determinar alterações hepáticas utilizando o microscópio de luz Olympus BX 41 e o programa Image Pro-Plus. As imagens digitalizadas foram obtidas através da câmera digital (Q-Color; Olympus) acoplada ao microscópio Olympus BX41.

#### 4.2.2.3.1- Índice apoptótico

A determinação do índice apoptótico (IA) foi realizado após observação de mudanças morfológicas das células. As células foram examinadas sob microscópio de fase e as alterações nucleares foram analisadas após coloração com H&E. Para a análise do IA, quinze campos de cada lâmina foram avaliados aleatoriamente (40x), selecionando a região central e evitando áreas de necrose. Foram consideradas células positivas para apoptose aquelas que apresentaram os



---

seguintes critérios morfológicos: (1) anoikis (célula contraída que perde a adesão de células adjacentes); (2) condensação nuclear (condensação da cromatina); (3) fragmentação nuclear e da membrana citoplasmática (sem cariorexis ou ruptura); e (4) formação de corpos apoptóticos resultando em fragmentação celular. O cálculo para IA foi: número de células com características de apoptose/ número das células totais. Utilizou-se Sigma Scan Pro 5 imaging program (Soini et al. 1998, Ribeiro et al. 2004).

Para marcação mais específica, a apoptose foi também avaliada por análise semi-quantitativa da fragmentação de DNA através da técnica de TUNEL (Terminal dUTP nick end labeling) utilizando o Kit comercial (FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Colorimetric-Calbiochem®) (Figura 13) (Gavrieli et al. 1992). Essa técnica consistiu na fixação do fígado em solução de formalina 10% e inclusão em parafina, desparafinização em xilol, desidratação em soluções alcóolicas e incubação por 10 minutos em tampão fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, e 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Os cortes foram incubados em solução de proteinase K (20 µg/mL) (2 mg/mL proteinase K em 10 mM Tris, pH 8) por 15 min a temperatura ambiente (TA) e lavados em tampão salina Tris (TBS, 150 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7.4) por 5 minutos. Peroxidase endógena foi inativada pela incubação por 5 minutos a com solução de 3% de peróxido de hidrogênio (10 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com 90 µl metanol) por 5 min a TA, lavadas posteriormente com dois banhos de TBS por 5 min, e re-incubadas por 20 min a TA em tampão de equilíbrio (1 M cacodilato de sódio, 0,15 M Tris, 1,5 mg/mL BSA, 3,75 mM CoCl<sub>2</sub>, pH 6,6). Os cortes foram incubados em câmara úmida a 37°C por 2 h com TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) e nucleotídeos e subseqüentemente incubadas em tampão de bloqueio (4% BSA em PBS) por 5 min a TA. Após lavagem com TBS por 5 min, os cortes foram incubados com peroxidase- estreptavidina conjugada em câmara úmida e TA por 1 h. Após lavagem por 5 min com TBS, DAB foi adicionado seguida de incubação por 10 min a TA, após diluição indicada pela fabricante (DAB, 0,7 mg/comprimido). Os cortes foram lavados em água de torneira e corados com metil green por 3 min. Finalmente, desidratados e montados com resina sintética Permount. A Figura 13 esquematiza os procedimentos acima descritos. Os hepatócitos foram considerados como positivos pelo TUNEL quando apresentaram

características de núcleo apoptótico e marcação em marrom escuro. Além da marcação marrom, as células devem apresentar os seguintes critérios morfológicos estabelecidos no item anterior com coloração H&E: (1) anoikis (célula contraída que perde a adesão de células adjacentes); (2) condensação nuclear (condensação da cromatina); (3) fragmentação nuclear e da membrana citoplasmática (sem cariorexis ou ruptura); e (4) formação de corpos apoptóticos resultando em fragmentação celular. Núcleos sem marcação marrom foram considerados negativos e os resultados foram expressos como porcentagem do total de hepatócitos, excluindo áreas de necrose. O índice apoptótico (IA = total número de células com características de apoptose/ número de células total  $\times$  100) determinados em 15 campos por lâmina utilizando o programa Image Pro-Plus.

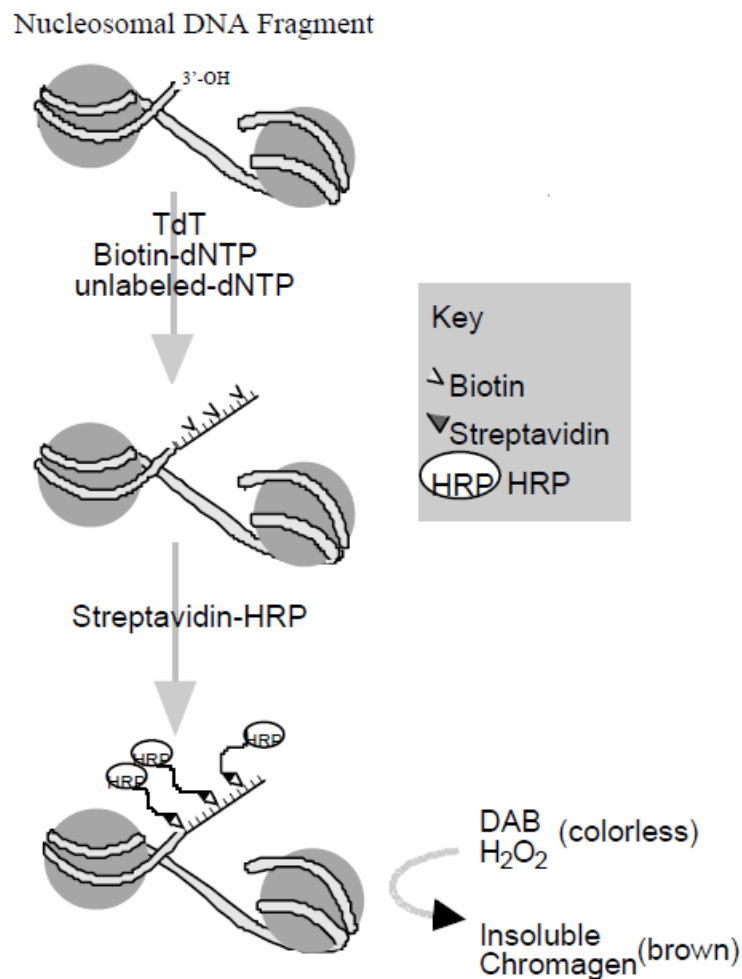


Figura 13: Representação esquemática do princípio da técnica de TUNEL

(Fonte: FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Colorimetric-Calbiochem®)

---

### 4.2.3- Ensaios *in vitro* em células HepG<sub>2</sub>

A linhagem de célula de hepatoma humano HepG<sub>2</sub>, estabelecida em 1979, é bem caracterizada e uma das linhagens celulares mais utilizadas em estudos de hepatotoxicidade (Niklas et al. 2009; Brandon et al., 2003; Wilkening et al., 2003), assim como modelo *in vitro*, utilizamos esta linhagem celular.

As células HepG<sub>2</sub> foram rotineiramente cultivadas em meio RPMI (RPMI meio 1640-Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS), em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) em incubadora umidificada e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. As células foram repicadas quando atingiam 90% de confluência.

#### 4.2.3.1- Ensaio de proliferação celular

No ensaio de proliferação celular, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de  $2 \times 10^4$  contidas em 1 mL de meio sem soro células/poço e esperou-se a sua aderência “overnight”. No dia seguinte, as células foram expostas a 5 mM de Sb provenientes dos compostos AM, AM1 ou Gluc e mantidas a 37°C em incubadora umidificada e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> até sua contagem, que ocorreu nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após exposição ao antimonial. Para contagem, as células foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato pH 7,4 – Gibco) e tripsinizadas para desaderirem da lamínula e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer. As células coradas com azul de tripan foram excluídas. Todos os ensaios foram feitos em triplicata em, pelo menos 3 repetições.

#### 4.2.3.2- Estudo de citotoxicidade

No ensaio de viabilidade celular, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço e esperou-se a ocorrência de sua aderência. No dia seguinte, as células foram expostas aos compostos AM, AM1 ou Gluc (5 mM de Sb) e mantidas a 37 °C em incubadora umidificada e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 20 horas de exposição aos antimoniais, 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazolium bromide tiazolil azul (MTT- 5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e aguardou-se 4 horas. O ensaio de MTT é baseado na

---

redução do tetrazolium, resultando na formação de formazan pela ação de monoxigenases mitocondriais (Mosmann 1983). Após a formação de cristais de formazan, estes foram solubilizados em DMSO e lidos em leitor de Elisa a 585 nm. Os resultados foram mostrados como percentual do grupo controle (não exposto ao antimonial).

#### **4.2.3.3- Avaliação da produção de ROS**

Para os ensaios de indução de ROS após exposição aos antimoniais, foram realizados ensaios em microscopia confocal, utilizando-se células HepG<sub>2</sub> mantidas em meio de cultura RPMI incubadas ou não com os diferentes compostos antimoniais. As células foram incubadas em placas de 6 poços na densidade de  $3 \times 10^5$  células/poço nos quais lamínulas 22 x 22 mm foram previamente colocadas para aderência das células. ROS foram quantificados através de microscopia confocal utilizando a sonda diaminoetidina (DHE- 50  $\mu$ M) (Calbiochem lote 309800) após pré -exposição aos fármacos por 24 horas. As células foram pré- incubadas com a sonda DHE por 30 minutos a 37°C e a leitura foi feita com excitação de 488 nm (Wilhelm et al. 2009).

#### **4.2.4- Análises estatísticas**

A comparação dos resultados entre os diferentes grupos experimentais foi realizada utilizando o software Prism 5.0. Utilizou-se análise de variância One-way ANOVA com pós teste Bonferroni para análises paramétricas ou Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunns para análises não paramétricas. As diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas com  $p < 0,05$ .

### **4.3- Resultados**

#### **4.3.1- Comparação da eficácia dos diferentes compostos antimoniais em modelo murino de LV**

No decorrer dos ensaios não foram observados indícios de sofrimentos que levassem a interrupção do tratamento. Da mesma forma, o pesos dos animais dos diferentes grupos foram similares.

A Figura 14 mostra os resultados das cargas parasitárias no fígado e baço de camundongos Balb/c experimentalmente infectados com *L. infantum* após tratamento com os antimoniais sintéticos (AM e AM1) e antimonial comercial (Gluc) por via IP. Todos os grupos tratados com antimoniais apresentaram cargas parasitárias semelhantes e significativamente menores que o grupo que recebeu apenas salina, tanto no fígado quanto no baço (Figura 14 A e B). Esses dados revelam que os compostos sintéticos, administrados por via parenteral, apresentam a mesma eficácia que o composto comercial em modelo murino de leishmaniose visceral. Sugere ainda que o Sb(III) residual não interfere na atividade antileishmanial desses compostos.

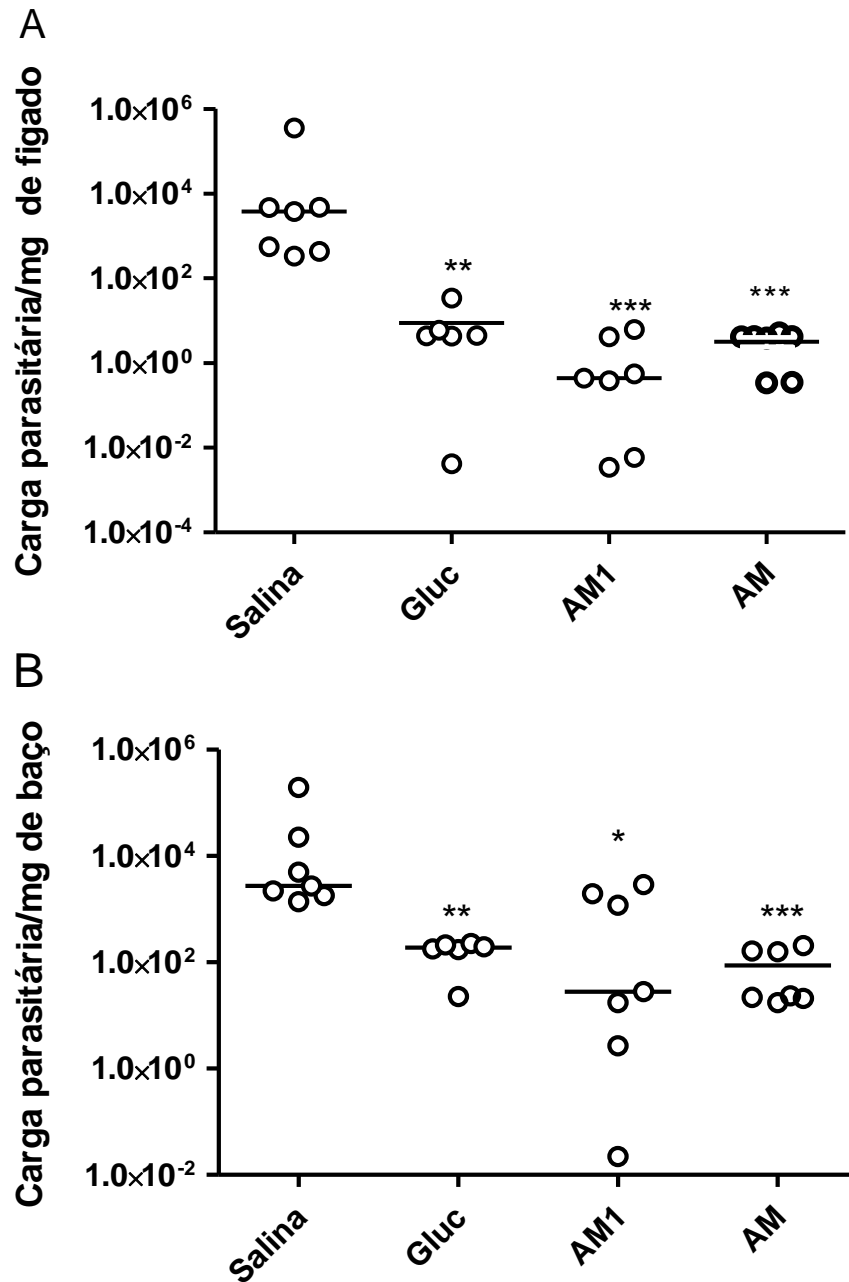


Figura 14- Cargas parasitárias no fígado (A) e baço (B) de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* após tratamento com diferentes compostos antimoniais. Antimoniais foram administrados por via intraperitoneal na dose de 80 mg Sb/kg/dia por 20 dias. Os gráficos mostram dados expressos individuais e mediana. (n=7). \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo salina. Análise com Mann Whitney.

### 4.3.2- Comparação da incorporação em macrófagos peritoneais

Como o macrófago é presente em grande número no fígado e representa a principal célula hospedeira do parasita leishmania, comparamos a quantidade de Sb incorporada em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss após incubação com os diferentes compostos antimoniais por 4 horas. A Figura 15 mostra que a incorporação de Sb foi significativamente maior para AM ( $0,41 \pm 0,021$ ) e AM1 ( $0,2859 \pm 0,0375$ ) em relação a Gluc ( $0,097 \pm 0,012$ ).

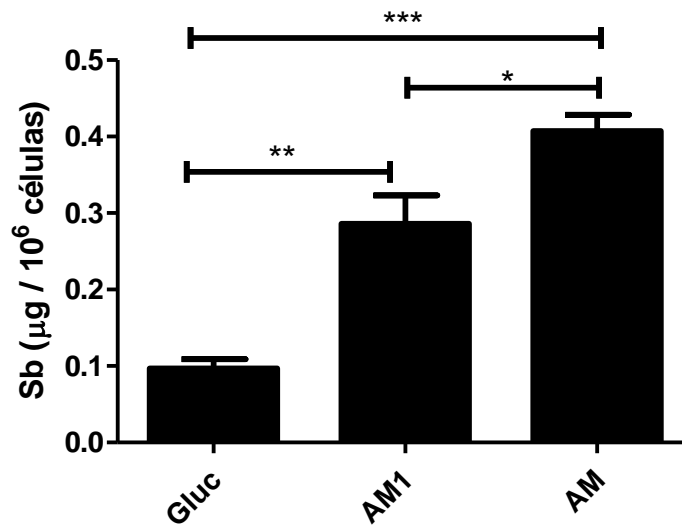


Figura 15: Incorporação de Sb por macrófago peritoneal murino após incubação com 0,8 mM de Sb provenientes de AM, AM1 e Gluc por 4 horas. Dados mostrados como média  $\pm$  EP. (n=3). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Análise com One Way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

### 4.3.3- Comparação da captação hepática de Sb

A Figura 16 mostra os resultados da quantificação de Sb no fígado dos camundongos infectados após tratamento com os diferentes antimoniais pentavalentes. Pode-se observar que AM apresenta captação hepática de Sb significativamente maior que Gluc. Este resultado correlaciona-se com a captação significativamente maior de Sb por macrófagos peritoneais a partir de AM.

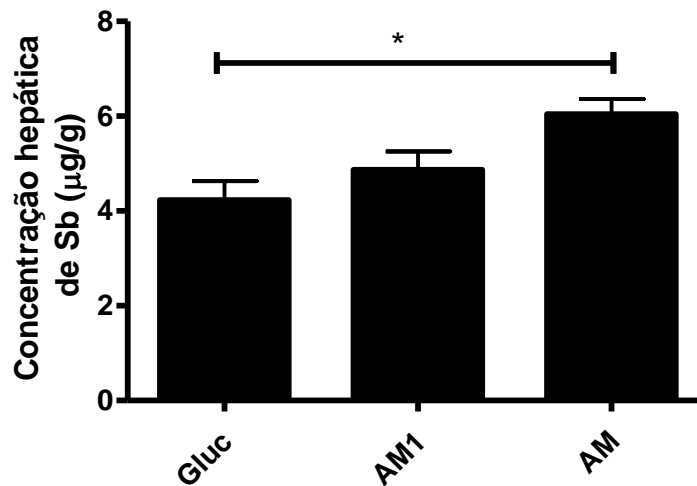


Figura 16: Concentração de Sb, no fígado de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum*, três dias após a última dose do tratamento intraperitoneal por 20 dias com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia). Os resultados são mostrados como médias  $\pm$  EP. (n=6). \* $p < 0,05$ . Análise com One Way ANOVA com pós – teste de Bonferroni.

#### 4.3.4- Comparação da toxicidade dos compostos antimoniais após tratamento em modelo murino de LV

##### 4.3.4.1- Alterações histopatológicas

A Figura 17 mostra, na microscopia de luz, a histologia do tecido hepático dos animais submetidos ao tratamento com os diferentes antimoniais. Podemos observar a citoarquitetura dos lóbulos hepáticos constituídos de veia central com cordões de hepatócitos separados por sinusóides, área portal composta por veia portal, artéria hepática e ducto biliar situado na periferia comuns a todos os grupos. Os hepatócitos mantiveram forma poligonal, com núcleo central e poucas células binucleadas, sendo que os hepatócitos dos grupos Gluc e AM apresentaram vacuolizações e do grupo AM1 apresentaram citoplasma granuloso.

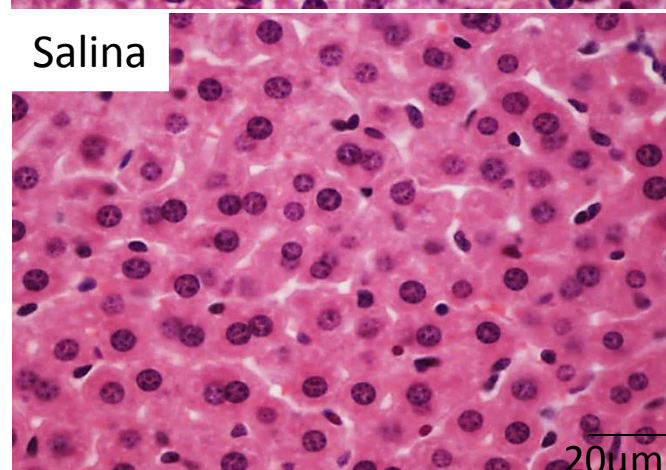
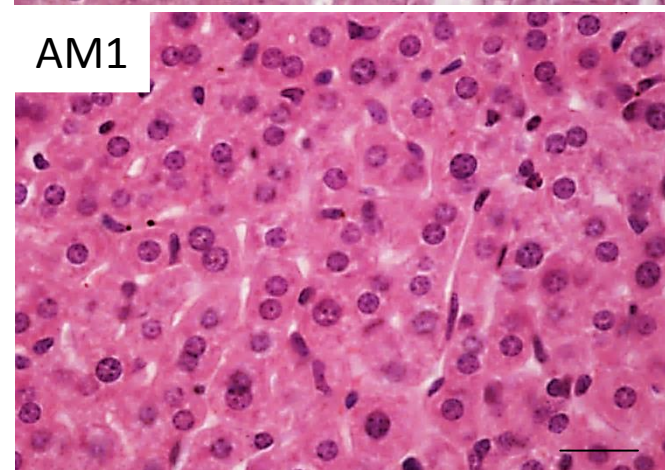
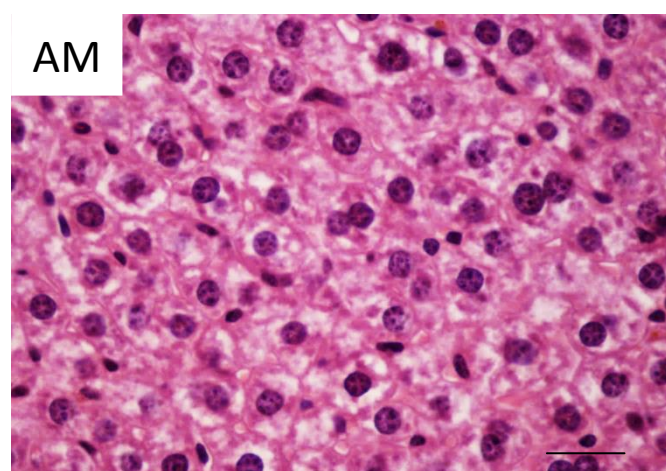
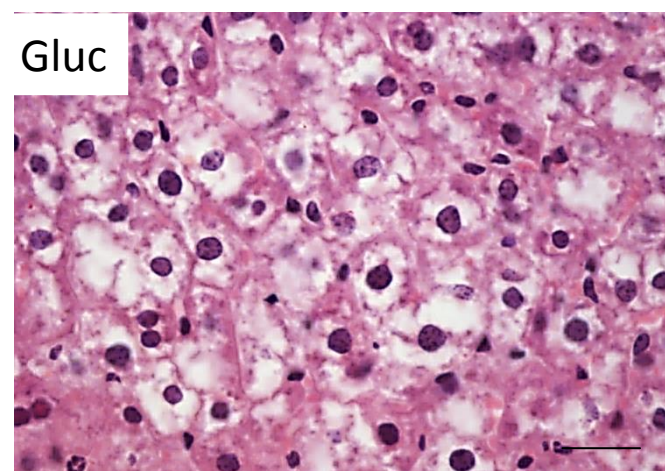
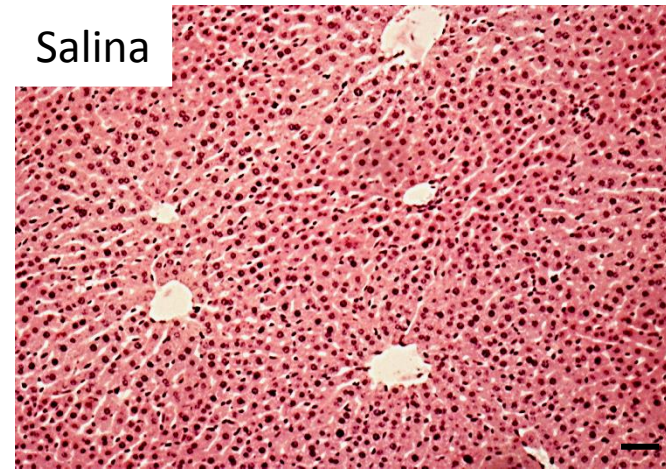
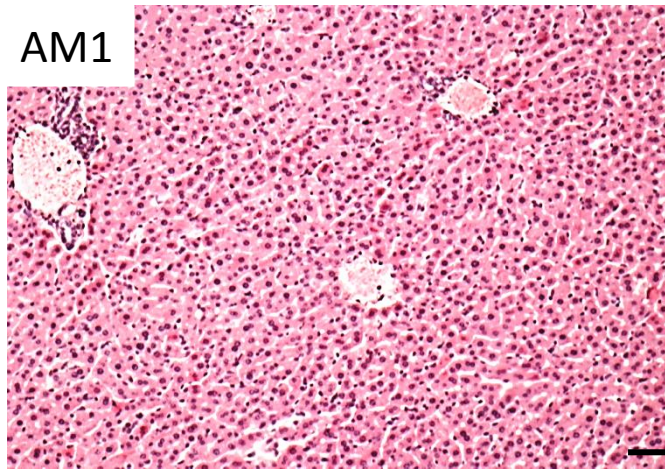
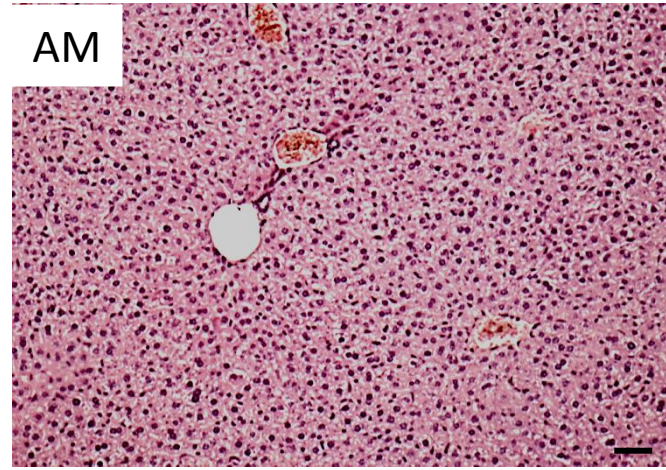
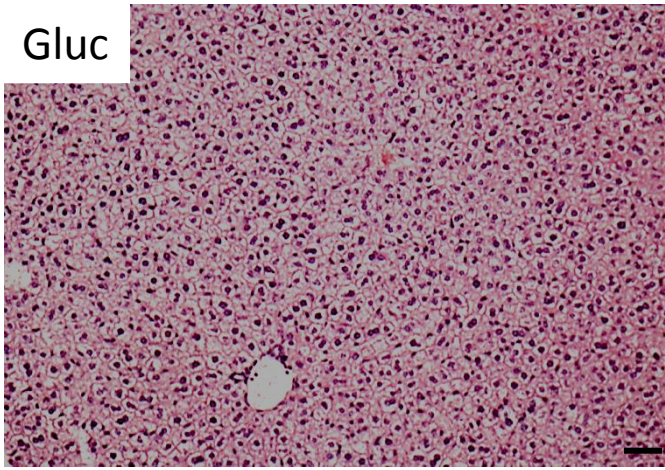
A Figura 18 mostra os resultados da quantificação das áreas lucentes que podem ser visualizadas na Figura 17, indicando proporção de área lucente significativamente maior nos grupos tratados com AM e Gluc que nos grupos não



tratados infectados ou não. Interessantemente, o grupo Gluc, apesar de menor concentração de Sb hepático, apresentou maior porcentagem de áreas lucentes em relação aos grupos AM e AM1, sugerindo maior hepatotoxicidade. O citoplasma dos hepatócitos dos animais tratados com AM1 apresentou aspecto granuloso e proporção de área lucente equivalente àquela dos grupos não expostos aos antimoniais. As alterações menos pronunciadas no caso do grupo tratado com AM1 correlacionam-se com o menor teor de Sb(III) residual deste composto. Os dados obtidos sugerem um possível papel dos metais-traços Sb(III) e As(III) na hepatotoxicidade do AM e Gluc. Entretanto, o fato de Gluc gerar alterações mais pronunciadas que o AM e apresentar menor teor de metais-traços, sugere que um outro fator, além de Sb(III), pode ter contribuído para estas alterações.

Vale mencionar que outros órgãos como coração, pâncreas, baço e rins também foram analisados após coloração com H&E (Figura 19) devido à existência de relatos na literatura de efeitos colaterais relacionados a estes órgãos, mas não observamos nenhuma alteração sob microscopia de luz digna de nota entre os grupos que receberam antimoniais e grupo salina, com exceção de alterações no tecido hepático (Figuras 17 e 18).





20µm



Figura 17 - Micrografias de hepatócitos de camundongos Balb/c infectados experimentalmente com *L. infantum* corados com H&E após tratamento com antimoniais sintéticos (AM e AM1) e comercial (Gluc) (80 mg Sb/kg/dia por 20 dias). Típica turgência, observada no Gluc; granulosidade intensa observada em AM; granulosidade menos intensa em AM1; e aspecto normal no grupo controle tratado com salina. (Barra=50 e 20  $\mu$ m, respectivamente, para figuras em menor e maior aumento).

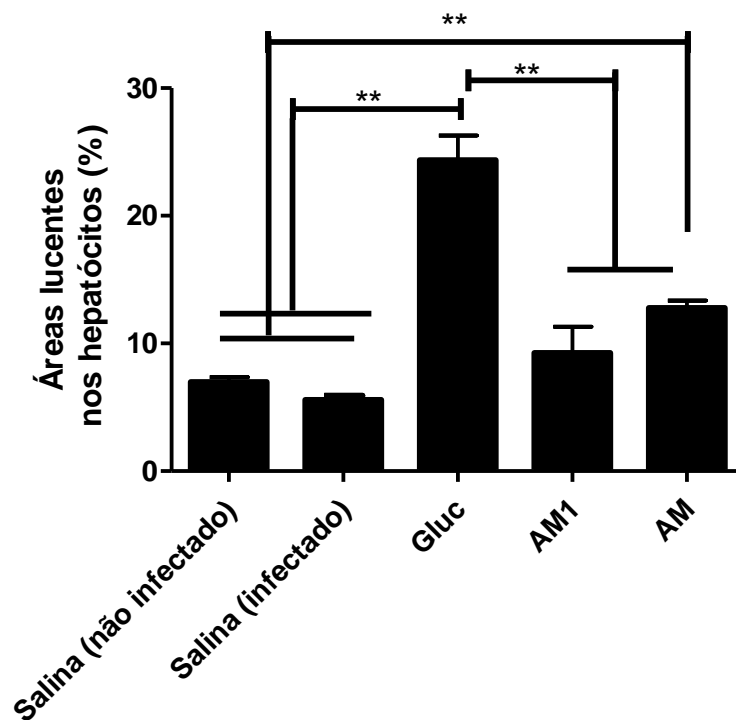


Figura 18: Porcentagem de área lucente nos citoplasmas dos hepatócitos após tratamento intraperitoneal com diferentes antimoniais AM, AM1 ou Gluc na dose de 80 mg Sb(V) /kg/dia por 20 dias, em camundongos Balb/c infectado ou não com *L. infantum*. Os resultados são mostrados como médias  $\pm$  EP. (n=6). \*\* $p < 0,01$ . Análise com One way ANOVA e pós- teste Bonferroni.

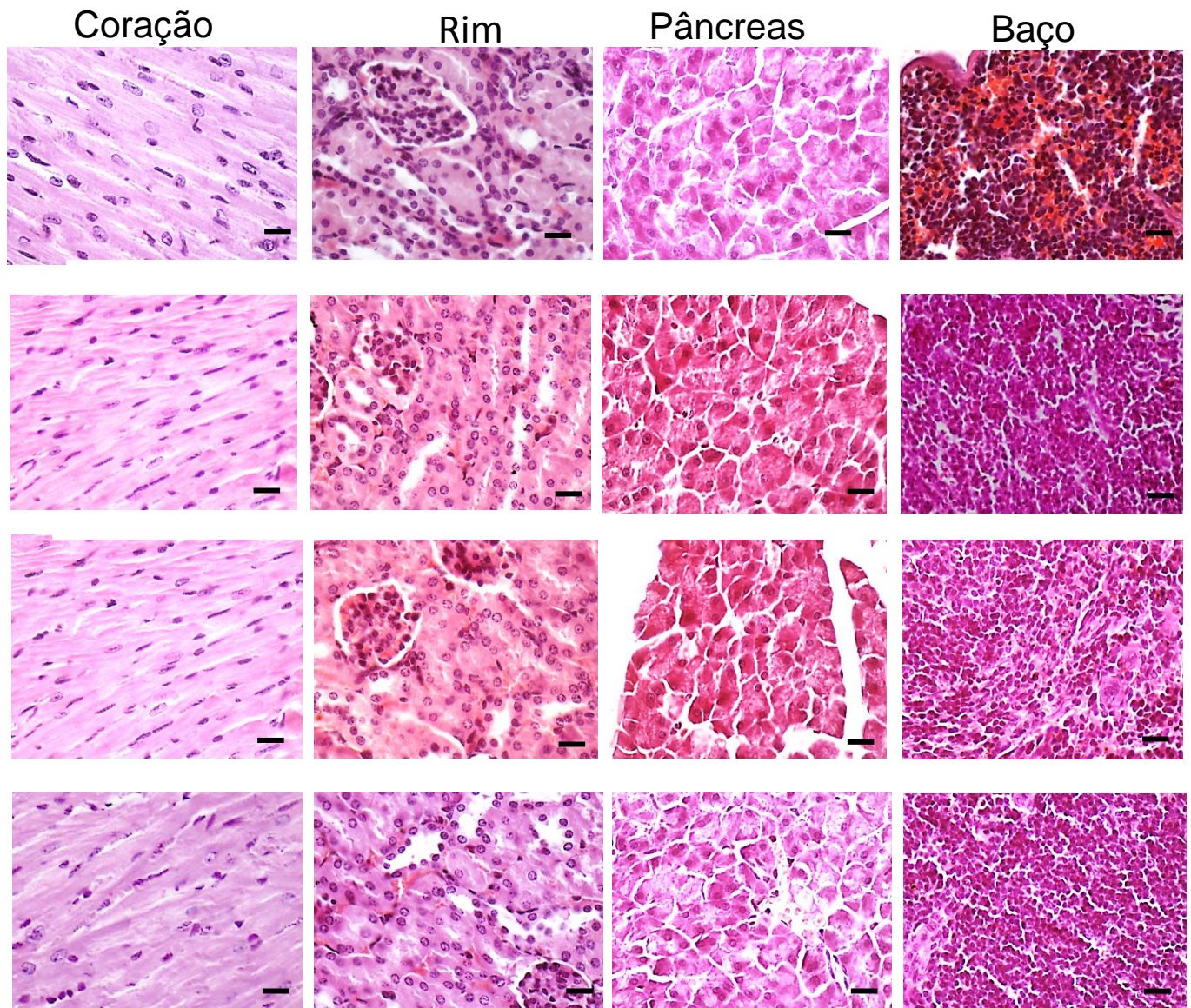


Figura 19 – Micrografias de luz mostrando aspectos histológicos da esquerda para direita coração, rins, pâncreas e baço murinos corados com a técnica de Hematoxilina & Eosina após tratamento com antimoniais. (80 mg Sb/kg/dia por 20 dias) e grupo salina. Aumento 40x (Barra= 20  $\mu$ m).

#### 4.3.4.2- Marcadores bioquímicos da função hepática

A Figura 20 mostra os resultados da análise bioquímica de marcadores séricos de função hepática dos camundongos, após tratamento com AM, AM1 e

Gluc. Os marcadores incluem o nível de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina.

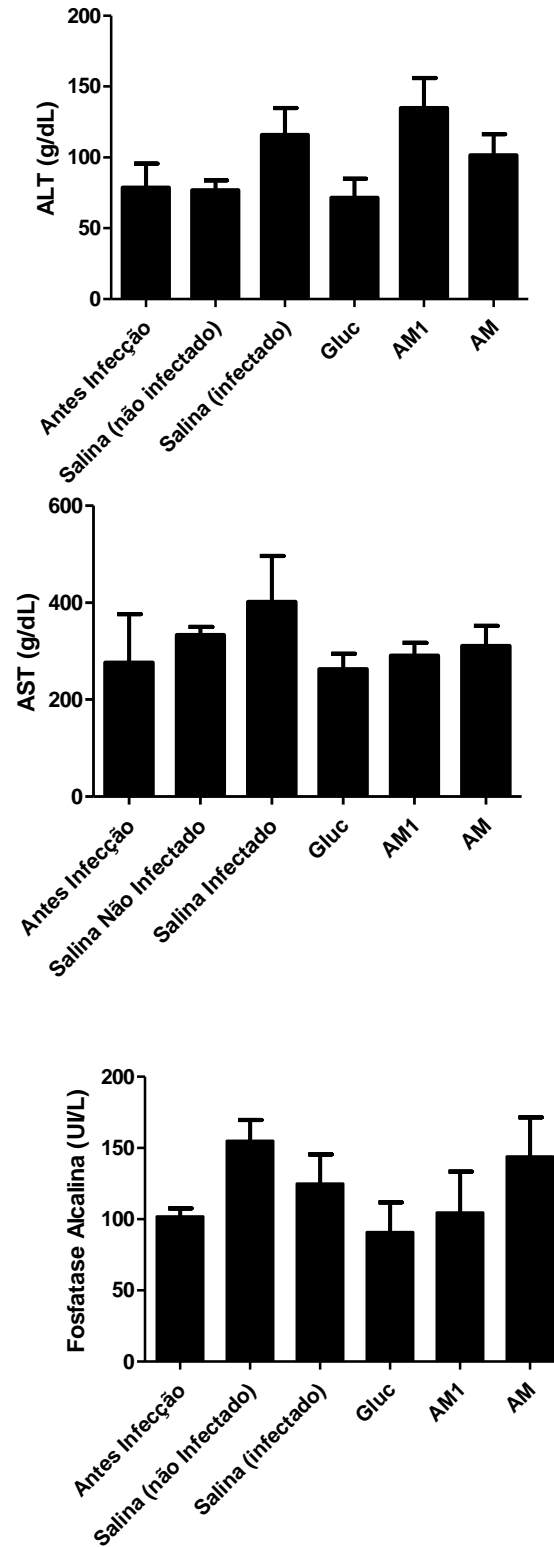


Figura 20: Níveis de enzimas hepáticas de camundongos Balb/c sadios ou infectados com *L. infantum*, submetidos ou não ao tratamento intraperitoneal por 20 dias com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) (A) alanina aminotransferase (ALT) (B) aspartato aminotransferase (AST) e (C) fosfatase alcalina. Os resultados são mostrados como médias  $\pm$  EP (n=7). Análise com ANOVA com pós teste Bonferroni.

A análise estatística dos dados mostra não haver aumento significativo no nível destes marcadores em decorrência da exposição aos antimoniais.

#### **4.3.4.3- Índice apoptótico no tecido hepático**

A avaliação do índice apoptótico no tecido hepático, mostrado na Figura 21 (A e B) mostrou valores significativamente mais elevados no grupo que recebeu Gluc em relação aos demais grupos, corroborando os dados descritos anteriormente que sugerem uma maior toxicidade do Gluc.

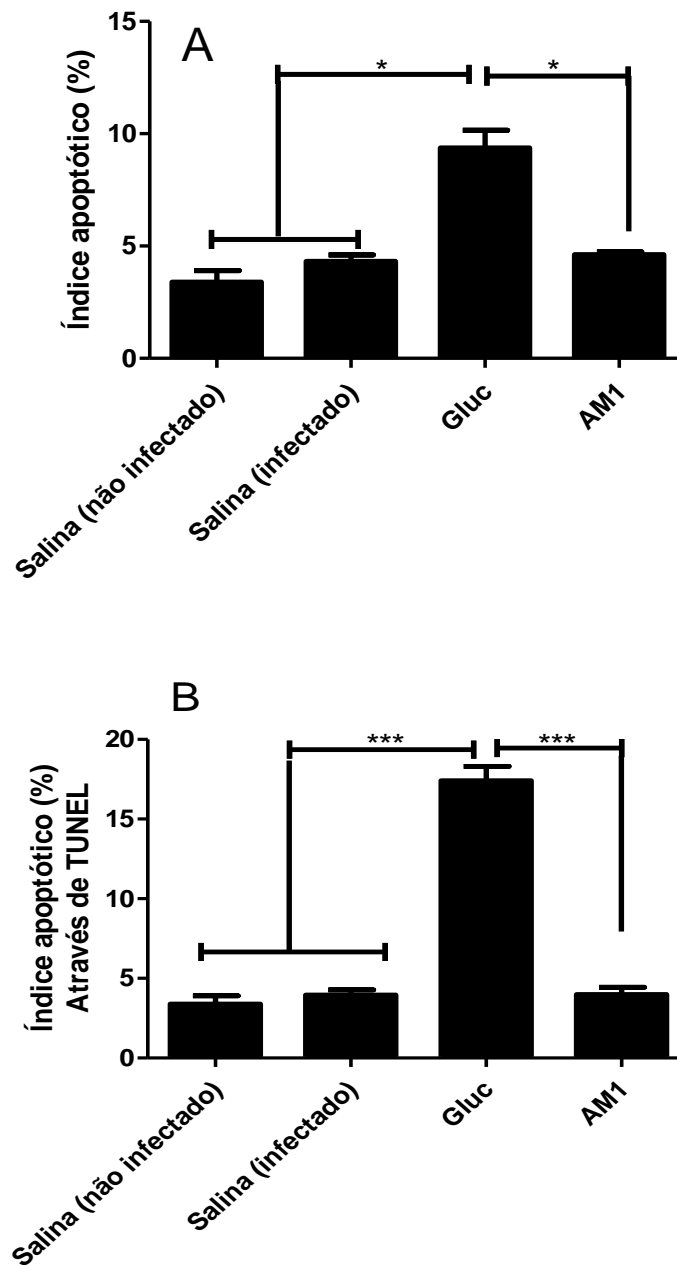


Figura 21: Índice apoptótico avaliado através de H&E (n=6/grupo) (A) e da técnica de TUNEL (n=3/grupo) (B) em cortes histológicos de fígado de camundongos saudáveis ou infectados com *L. infantum*, submetidos ao tratamento com diferentes antimoniais pentavalentes (80 mg Sb/Kg/dia por 20 dias). Dados mostrados como médias  $\pm$  EP. \*\*\*  $p < 0,001$ . Análise com ANOVA com pós teste Bonferroni.



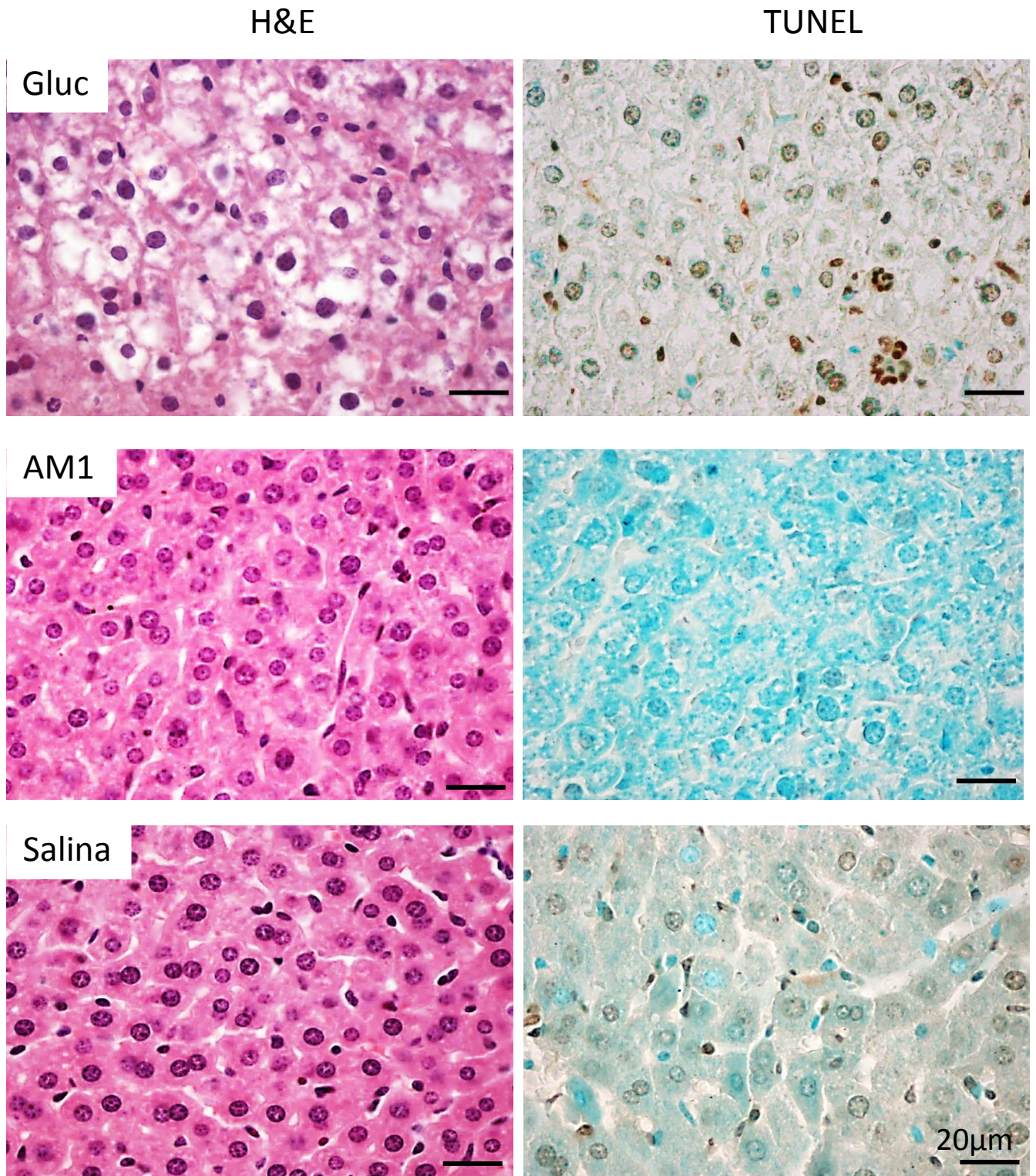


Figura 22: Micrografias ilustrando a apoptose dos hepatócitos através de H&E (coluna esquerda) ou da técnica de TUNEL (coluna direita) em corte histológico de fígado de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* submetidos ao



tratamento com diferentes antimoniais pentavalentes (80 mg Sb/Kg/dia por 20 dias). (Barra= 20  $\mu$ m)

#### 4.3.4.4- Atividade da peroxidase

A atividade peroxidase foi avaliada no tecido hepático utilizando o seu substrato, visando surpreender um possível aumento desta atividade como resultado do estresse oxidativo causado pela quimioterapia antimonial (Figura 23).

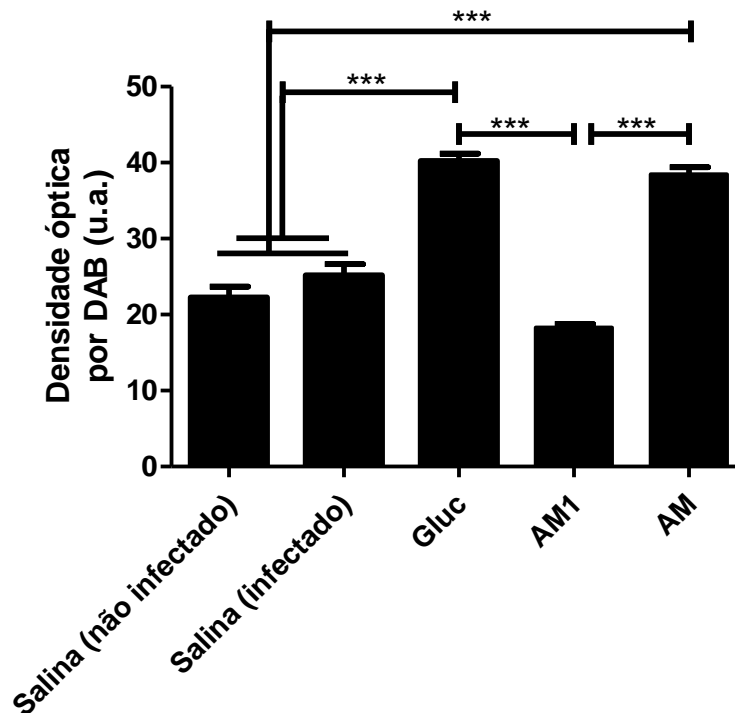


Figura 23- Atividade peroxidase determinada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em corte histológico de fígado de camundongos Balb/c sadios ou infectados, tratados ou não com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia por 20 dias). Dados mostrados como médias do percentual da área marcada  $\pm$  EP (n=3). \*\*\* $p$ <0,001. Análise com Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's

A Figura 23 mostra que os grupos AM e Gluc apresentaram marcação significativamente maior que os grupos controle e o grupo que recebeu AM1. Esses dados indicam a indução de atividade da peroxidase em maior nível no grupo AM e Gluc que no AM1, sugerindo um maior estresse oxidativo. Portanto, as maiores alterações histopatológicas nos tecidos observadas após AM e Gluc correlacionam-se com a maior atividade da peroxidase, sugerindo que as alterações histológicas são decorrentes de estresse oxidativo. Segundo Fahimi (2009), a atividade peroxidativa da catalase, que é abundante nos peroxisomas seria responsável por esta coloração.

#### **4.3.5- Influência do co-tratamento com ácido ascórbico na eficácia e toxicidade dos diferentes compostos antimoniais**

##### **4.3.5.1- Interferência do AA na eficácia e no acúmulo hepático de Sb**

A fim de investigamos a interferência do AA na eficácia dos compostos antimoniais, camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* foram tratados com compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) na presença ou ausência do AA (15 mg Sb/kg/dia) durante 20 dias. A Figura 24 mostra que o co-tratamento com AA não influenciou a eficácia dos compostos antimoniais AM e AM1 em modelo de LV no fígado e baço. Entretanto, enquanto o AA não afeta a capacidade de redução da carga parasitária do Gluc no fígado, este aumenta a eficácia do Gluc por reduzir a carga parasitária no baço.

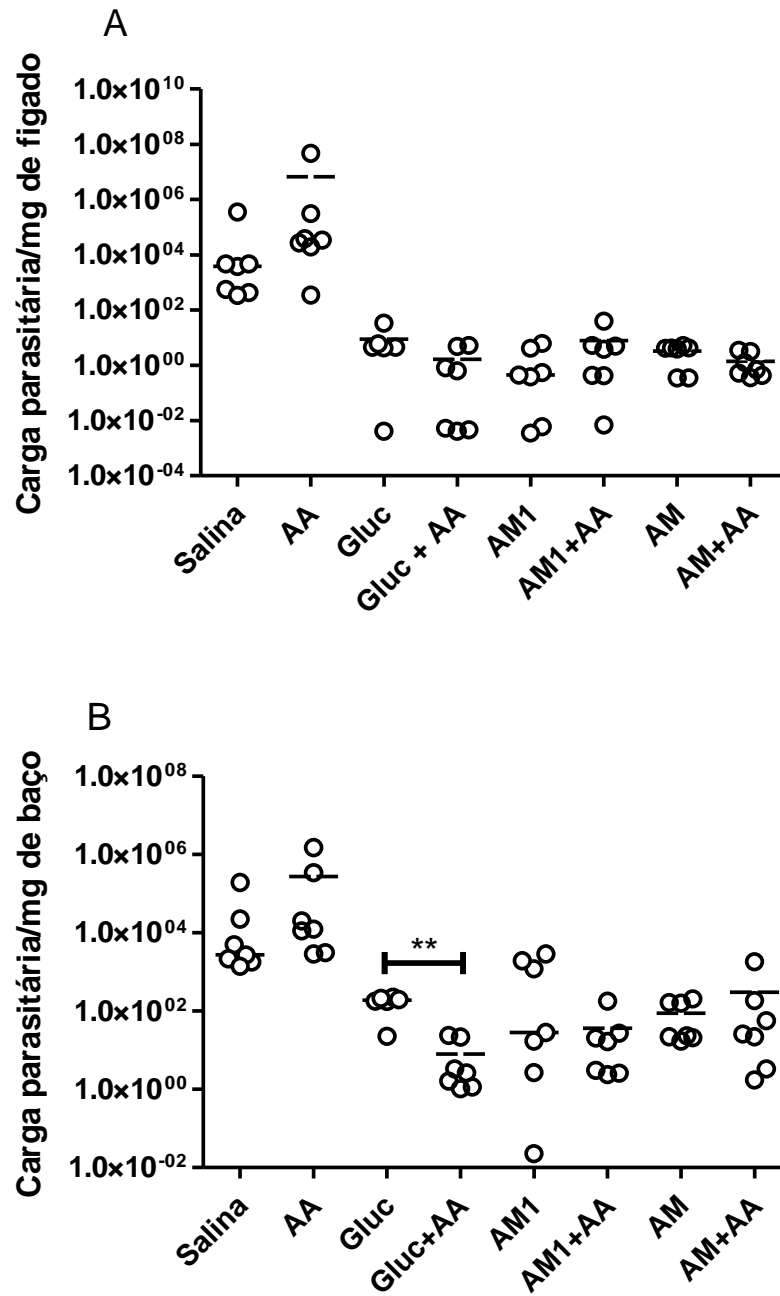


Figura 24- Cargas parasitárias no fígado (A) e baço (B) de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* após tratamento com diferentes compostos antimoniais em associação ou não com ácido ascórbico. Antimoniais e ácido ascórbico foram administrados por via intraperitoneal nas doses de 80 mg Sb/kg/dia e 15 mg/kg/dia, respectivamente, por 20 dias. Os gráficos mostram dados expressos individuais e a mediana. (n=7) \*\*  $p < 0,01$ . Análise com teste t Student com pós teste Mann Whitney.

A Figura 25 mostra as concentrações de Sb no fígado dos animais após tratamento na presença ou ausência de AA. Pode-se observar que a associação com AA não influenciou significativamente o acúmulo hepático de Sb.

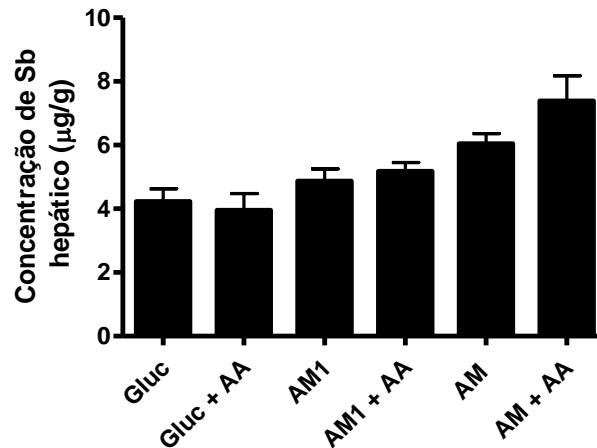


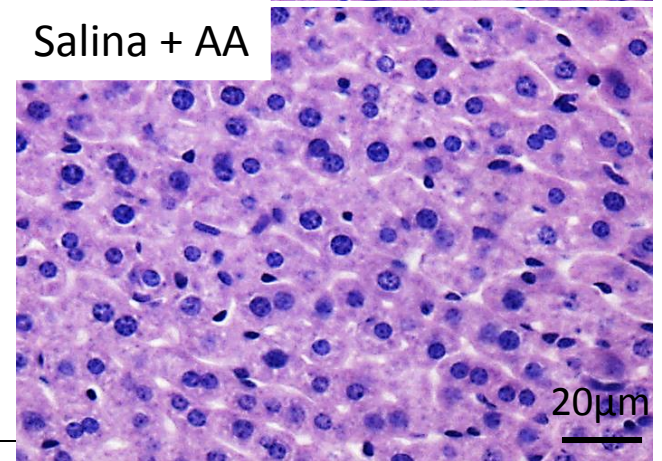
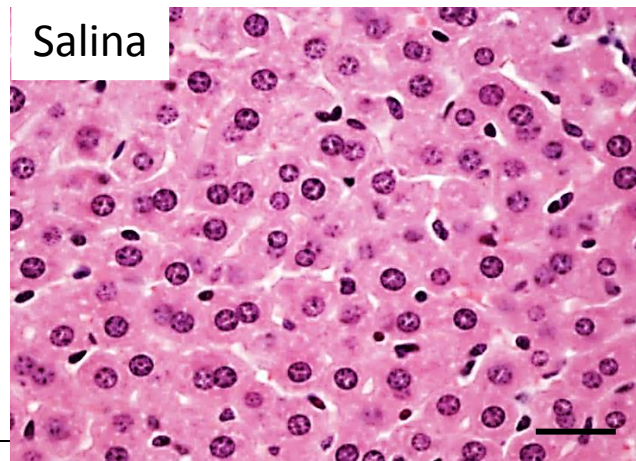
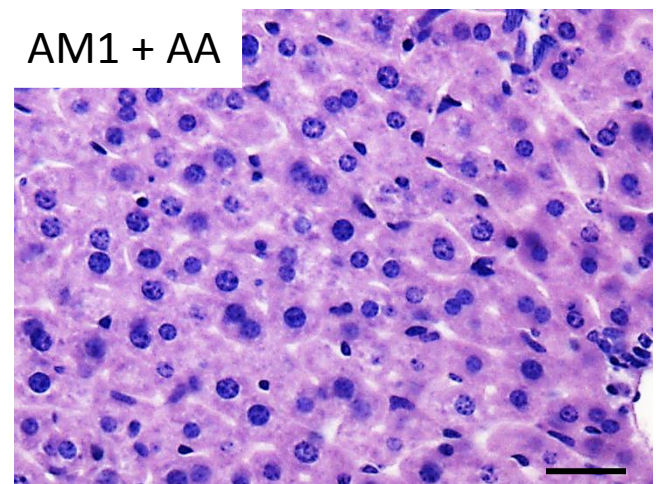
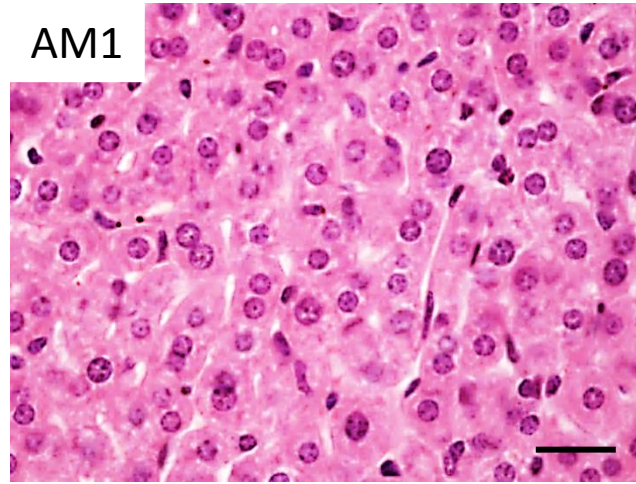
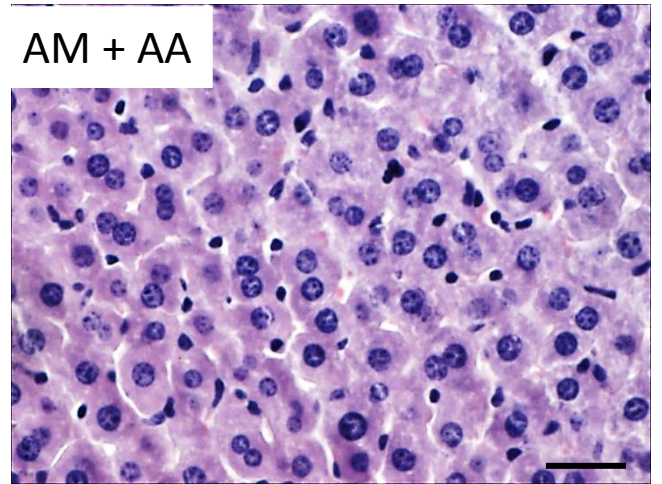
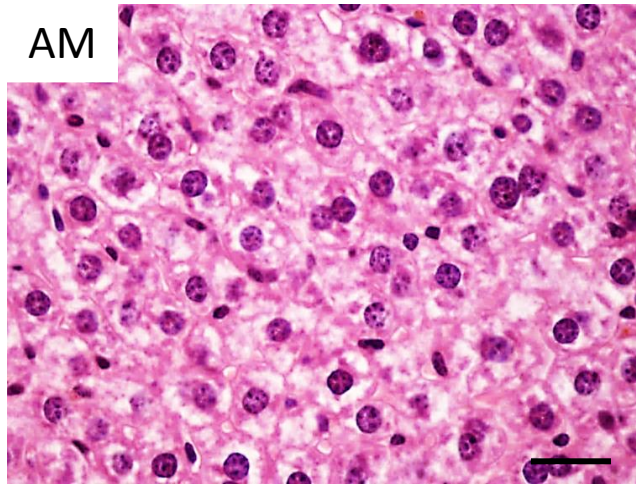
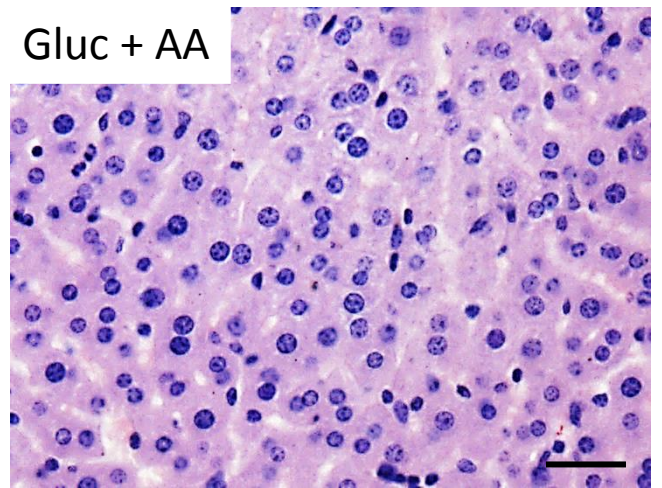
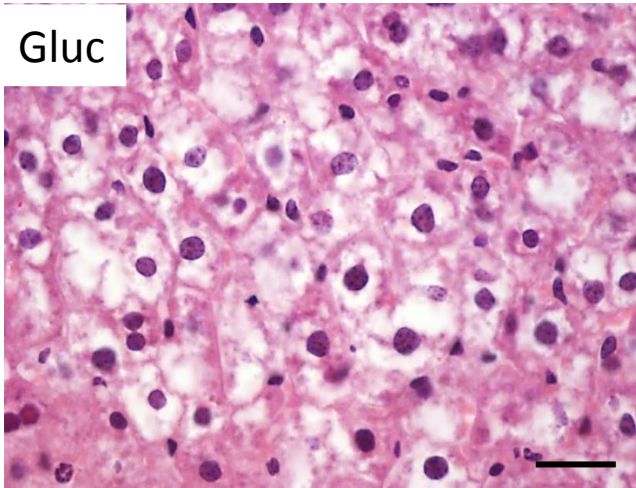
Figura 25: Concentração hepática de Sb em camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* três dias após a última dose do tratamento de 20 dias por via IP com antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) em associação ou não com AA (15 mg/kg/dia). Os resultados são mostrados como médias  $\pm$  EP. (n= 7).  $p > 0,05$  para as comparações entre os grupos com e sem AA. Análise com teste t student.

#### 4.3.5.2- Interferência do AA na toxicidade dos antimoniais

##### 4.3.5.2.1- Alterações histopatológicas

A prancha apresentada na Figura 26 mostra a análise morfológica do tecido hepático dos camundongos após tratamento com os antimoniais em associação ou não com AA. A Figura 27 mostra quantitativamente a porcentagem da área lucente dos hepatócitos. A associação com AA, no caso de todos os compostos antimoniais, promoveu redução significativa da área lucente.





20µm



Figura 26- Micrografias de hepatócitos de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* corados com H&E após tratamento por via IP com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) em associação ou não com ácido ascórbico (15 mg/kg/dia) por 20 dias. Típica turgência, observado no grupo Gluc, granulosidade intensa observado em AM, granulosidade menos intensa em AM1, aspecto normal no grupo controle e aspecto típico normal nos grupos antimoniais associados ao AA ou tratados somente com AA. (Barra=20  $\mu$ m).

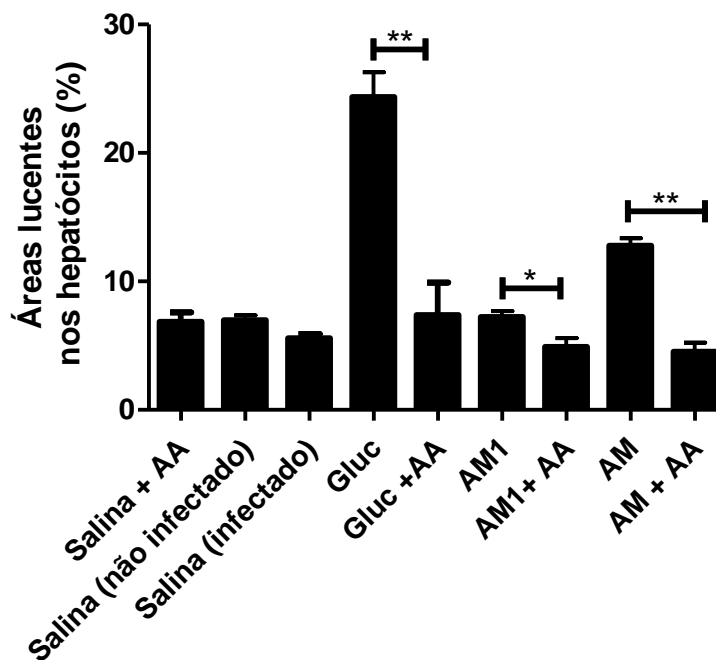


Figura 27: Efeito do co-tratamento com AA na porcentagem de área lucente no citoplasma de hepatócitos de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* após tratamento por via IP com antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) em associação ou não com ácido ascórbico (15 mg/kg/dia) por 20 dias. Dados mostrados como média  $\pm$  EP. (n=7). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Análise com teste t student com pós teste Mann Whitney

#### 4.3.5.2.2- Indução da atividade de peroxidase

Avaliamos o efeito do co-tratamento com AA na atividade da peroxidase no fígado dos camundongos infectados submetidos à quimioterapia antimonial, já que observou-se um aumento desta atividade nos animais tratados com AM e Gluc e que

o AA, como um antioxidante, poderia atuar como *scavenger* de espécies reativas de oxigênio induzidas pelos compostos antimoniais.

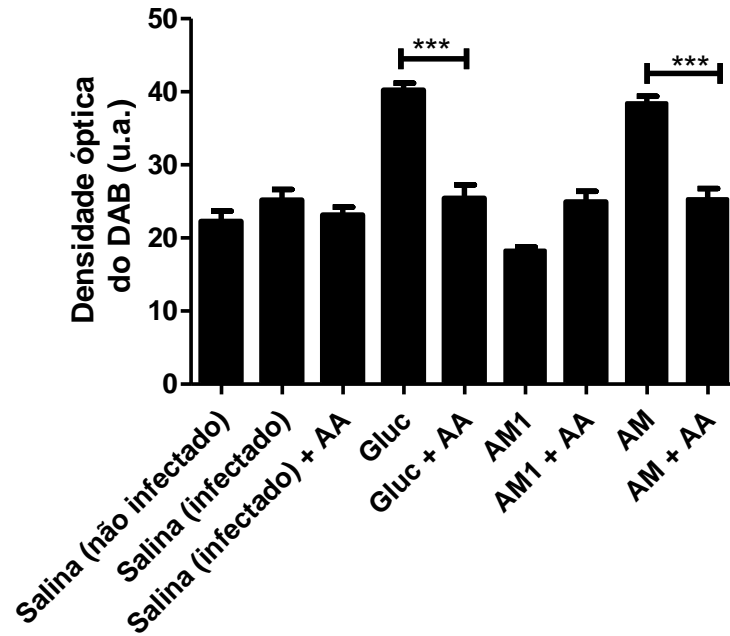


Figura 28- Influência do AA (15 mg/kg/dia por 20 dias) na atividade da peroxidase na em corte histológico de fígado de camundongos Balb/c sadios ou infectados com *L. infantum* e tratados ou não com diferentes compostos antimoniais (80 mg Sb/kg/dia) por 20 dias por via IP. Atividade da peroxidase avaliada pela marcação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Dados mostrados como médias do percentual da área marcada  $\pm$  EP (n=3). \*\*\* $p < 0,001$ . Análise com teste t student para comparações entre os grupos tratados com e sem AA.

Os resultados da Figura 28 indicam que o co-tratamento com AA reduziu significativamente a atividade da peroxidase nos animais que receberam AM e Gluc, sugerindo que o fornecimento de um antioxidante ao tecido hepático como o AA, mesmo sob estresse da ação antimonial, torna desnecessária a indução da atividade da peroxidase.

#### 4.3.5.2.3- Indução de apoptose dos hepatócitos

A fim de averiguar a ação hepatoprotetora do AA em relação aos efeitos tóxicos do Gluc, o índice apoptótico nos hepatócitos foi comparado entre os grupos

tratados com antimonial na ausência e presença de AA, através da análise quantitativa da ocorrência de eventos apoptóticos nos hepatócitos e da técnica de TUNEL.

Como ilustrado nas Figuras 29, 30 e 31, ambas avaliações mostraram que o co-tratamento com AA promoveu uma redução do índice apoptótico no grupo que recebeu Gluc para valores próximos ao grupo controle não tratado com antimonial. Este dado sugere que o fornecimento de um antioxidante ao tecido hepático, mesmo sob estresse da ação antimonial, diminui a sinalização para a apoptose, resultando em menores danos à célula hepática.

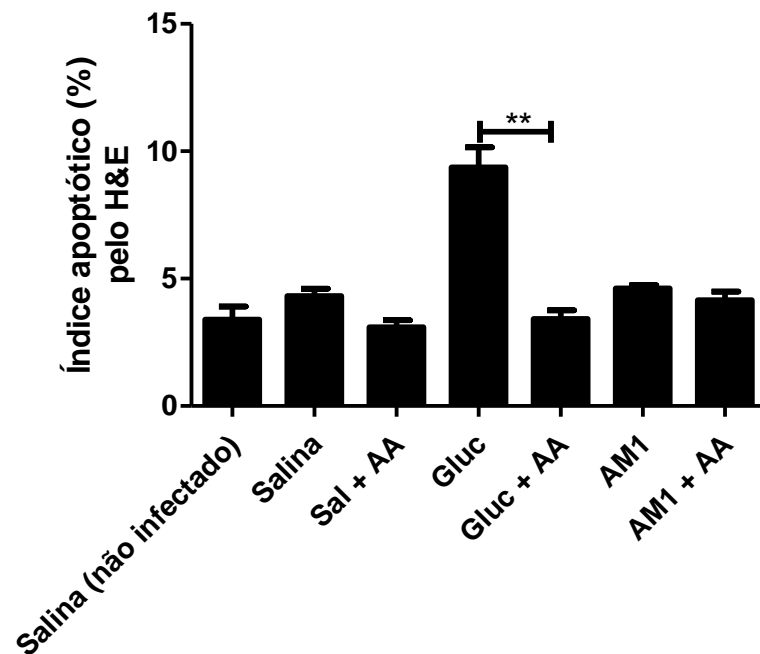


Figura 29: Influência do co-tratamento com AA (15 mg/kg/dia) no índice apoptótico (H&E) em corte histológico de fígado de camundongos Balb/c sadios ou infectados com *L. infantum* e submetidos ao tratamento ou não com Gluc (80 mg Sb/kg/dia) por 20 dias por via IP. Dados mostrados como médias  $\pm$  EP. (n=6/grupo). \*\* $p < 0,01$  Análise com teste t student com pós teste Mann Whitney para comparação entre os grupos tratados com e sem AA.



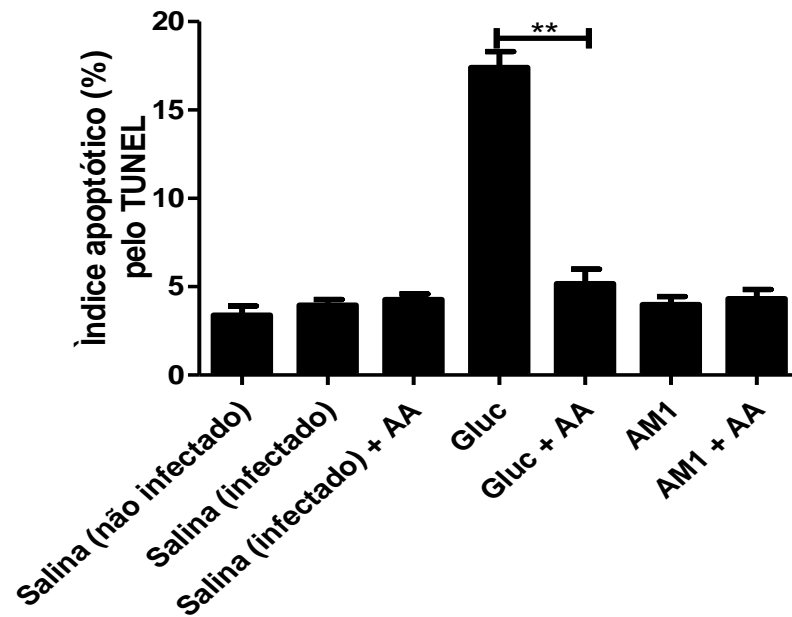


Figura 30. Influência do co-tratamento com AA (15 mg/kg/dia por 20 dias por via IP) no índice apoptótico dos hepatócitos de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* que receberam Gluc ou AM1 (80 mg Sb/kg/dia) por 20 dias por via IP através da análise por TUNEL em cortes histológicos de fígado. Camundongos não infectados receberam salina. Dados são apresentados como médias  $\pm$  EP. (n=3). \*\* $p < 0,01$ . Análise com teste t student com pós teste Mann Whitney para comparação entre os grupos tratados com e sem AA.

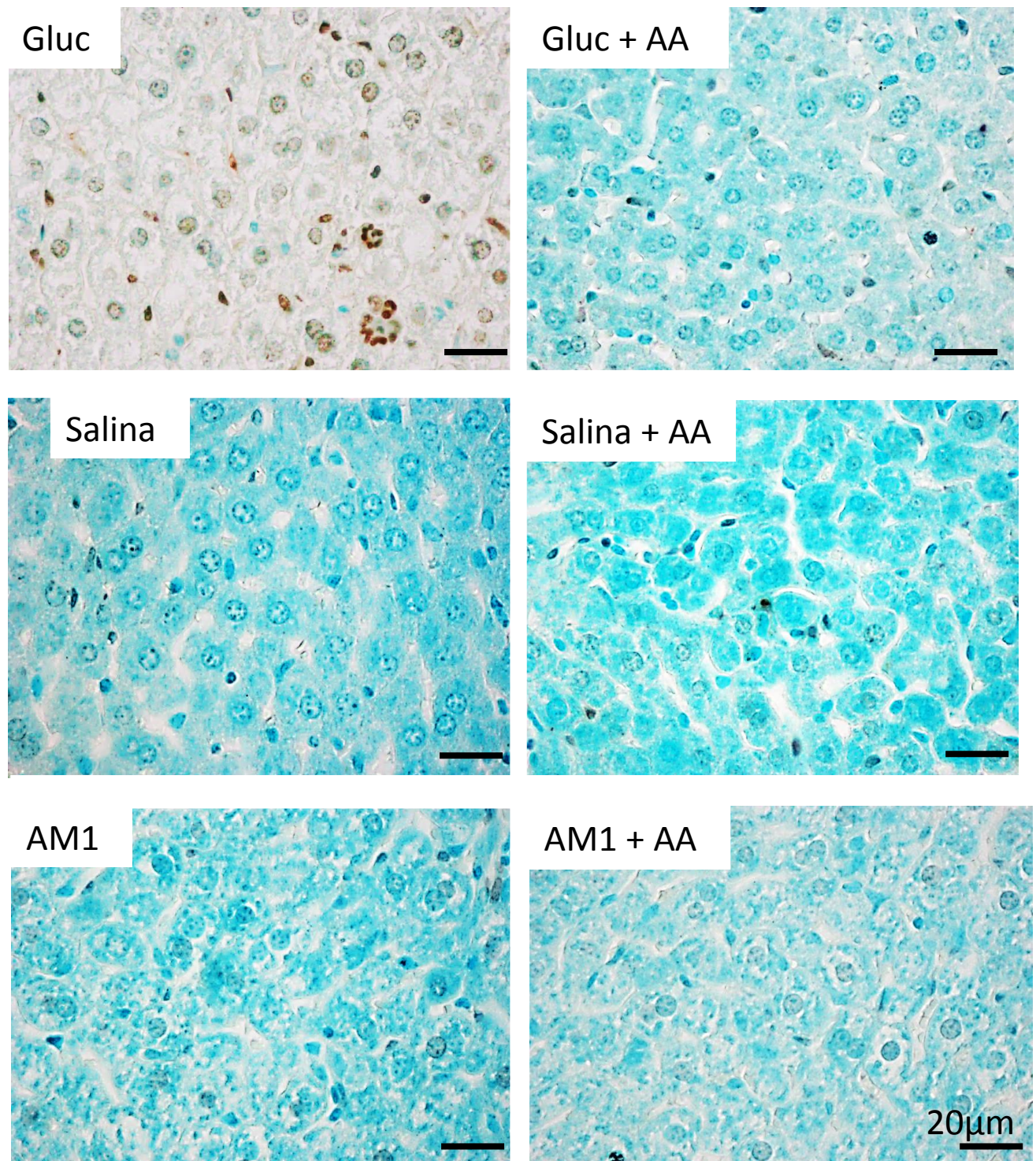


Figura 31: Micrografias de corte histológico de fígado, submetidos à técnica de TUNEL, provenientes de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* e tratados ou não com Gluc e AM1 (80 mg Sb/kg/dia) na presença ou ausência de AA (15 mg/kg/dia) por 20 dias por via IP. Os grupos representados são: Gluc, Salina, AM1,

Gluc + AA, Salina + AA e AM1 + AA. As células apoptóticas aparecem com marcação nuclear de coloração marrom. (Barra = 20  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.3.6- Citotoxicidade e indução da produção de ROS em células HepG<sub>2</sub>

##### 4.3.6.1- Inibição do crescimento celular e citotoxicidade

Buscando complementar nossos achados *in vivo* sobre os efeitos dos compostos antimoniais em hepatócitos, propomos confirmar no modelo *in vitro* de células de hepatoma humano (HepG<sub>2</sub>), as diferenças de citotoxicidade entre os diferentes antimoniais e a indução de ROS em decorrência da exposição a estes compostos.

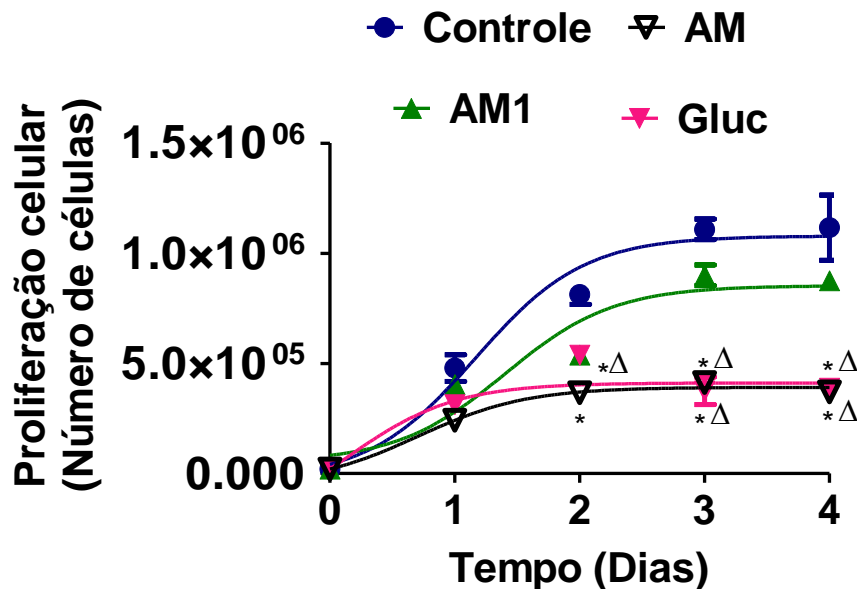


Figura 32: Curvas de crescimento de células HepG<sub>2</sub>, em função do tempo na presença de diferentes compostos antimoniais na concentração de 5 mM de Sb. Os dados são mostrados como média  $\pm$  EP. (n=3).  $p < 0,05$  e \* = diferença significativa em relação ao grupo Controle;  $\Delta$  = diferença em relação ao AM1. Análise com teste t student com pós teste Mann Whitney.

A Figura 32 mostra os resultados do ensaio de proliferação celular na presença dos diferentes compostos antimoniais na mesma concentração de 5 mM de Sb. Observa-se que o Gluc e AM promoveram uma inibição do crescimento celular em relação ao grupo controle e AM1, a partir do segundo dia de exposição aos antimoniais, fato que não foi observado com AM1.

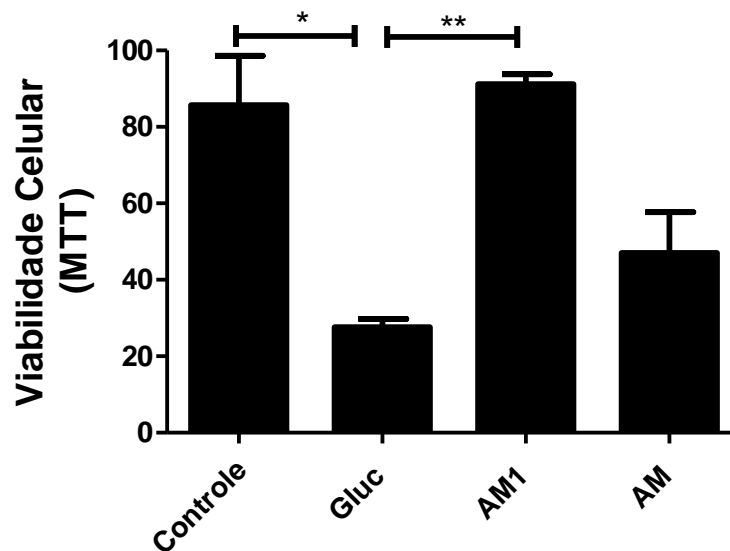


Figura 33: Citotoxicidade dos diferentes compostos antimoniais (AM, AM1, Gluc) na concentração de 5 mM de Sb, determinada pelo método de MTT, após exposição de células HepG<sub>2</sub> por 24 hs. Dados mostrados como média  $\pm$  EP. (n=3). Análise com Kruskal-Wallis com pós teste Dunn's \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

A citotoxicidade dos diferentes compostos antimoniais em células HepG<sub>2</sub> foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT após exposição por 24h na concentração de 5 mM de Sb. Como ilustrado na Figura 33, o AM e Gluc mostraram-se citotóxicos ao contrário de AM1.

#### 4.3.6.2- Produção de ROS

Foram realizados ensaios com a sonda fluorescente DHE para avaliar a produção de ROS em células HepG<sub>2</sub> após exposição aos diferentes compostos antimoniais.

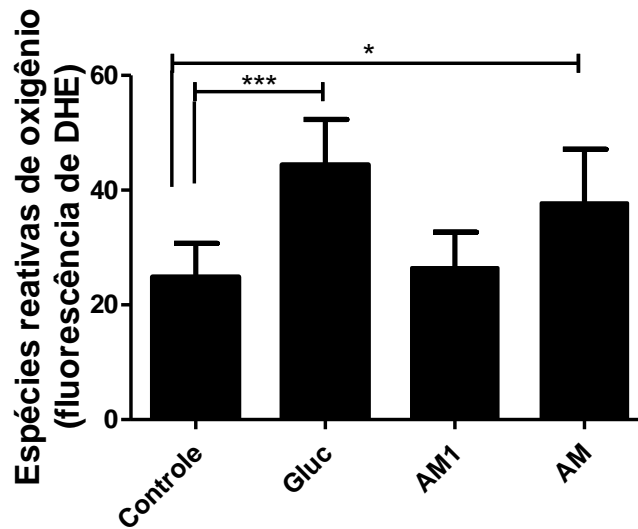


Figura 34: Produção de ROS em células HepG<sub>2</sub> (n=3) medida através de intensidade de fluorescência da sonda DHE, por microscopia confocal, após exposição aos antimoniais sintéticos (AM, AM1) ou comercial (Gluc) por 24 hs na concentração de 5 mM de Sb. Dados mostrados como média ± EP. (n=3).\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$ . Análise com Kruskal Wallis com pós- teste Dunn's.



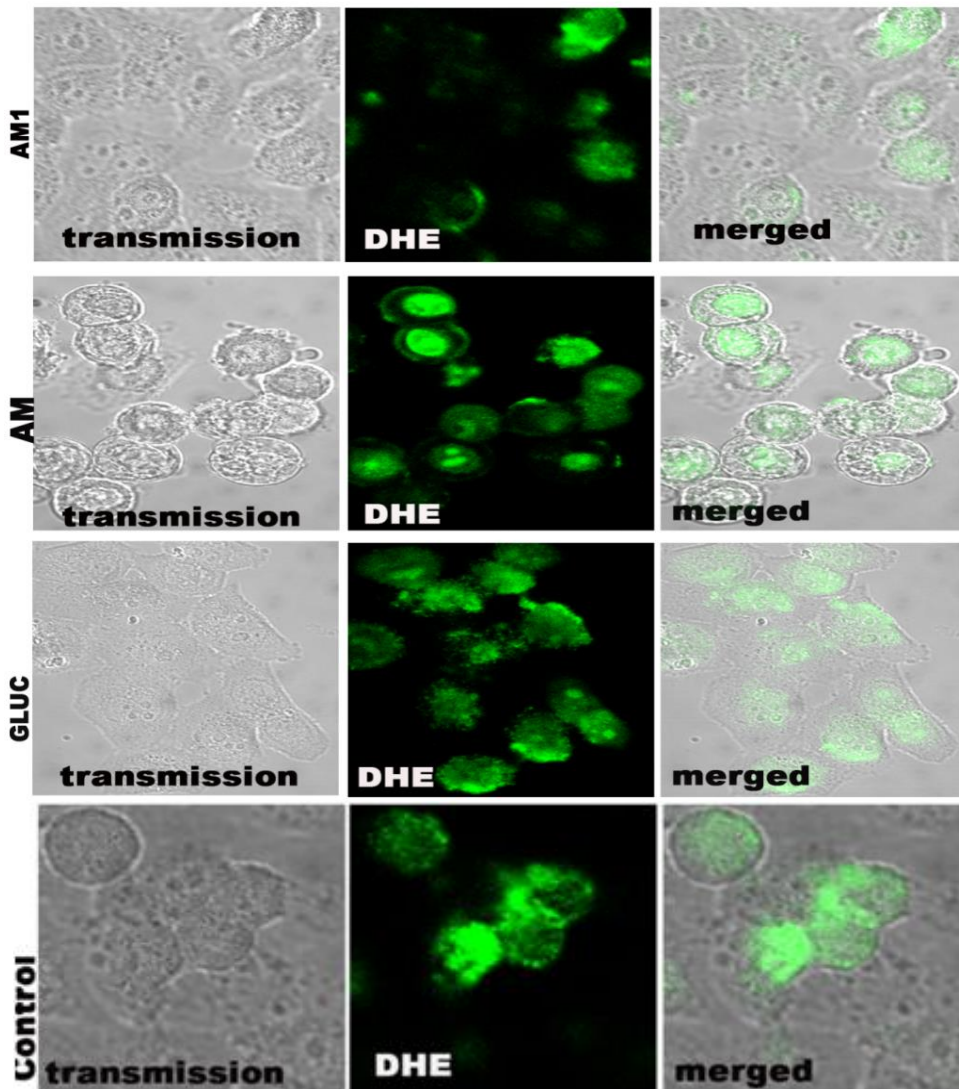


Figura 35: Micrografias de fluorescência de células HepG<sub>2</sub> carregadas com sonda DHE, após exposição após antimoniais sintéticos (AM e AM1) ou comercial (Gluc) por 24 hs na concentração de 5 mM de Sb.

A Figura 34 mostra que a intensidade da fluorescência da sonda nos grupos tratados com AM e Gluc foi significativamente maior, quando comparada àquela dos grupos AM1 e controle. Este dado indica que os compostos AM e Gluc geram maior quantidade de ROS levando à um maior estresse oxidativo. Na Figura 35 pode-se observar micrografia representativa da resposta de cada grupo à exposição ao Sb.

---

#### 4.4- Discussão

Conforme os achados do primeiro capítulo desta tese, as formas sintéticas (AM e AM1) e comercial (Gluc) do antimoniato de meglumina mostraram diferenças na sua estrutura e teor de Sb(III) residual. Neste segundo capítulo, comparamos a eficácia e toxicidade destes compostos em modelo murino de leishmaniose visceral.

Relatamos pela primeira vez alterações histopatológicas características de degeneração hidrópica no fígado dos animais após tratamento sub-crônico com Gluc e AM. Tais alterações não foram observadas no grupo tratado com AM1.

A ausência de alterações histológicas nos outros órgãos analisados (coração, rins, pâncreas e baço) poderia ser explicado pela menor captação dos antimoniais pentavalentes nesses órgãos, quando comparados ao fígado (Carter et al. 1988).

As alterações histológicas observadas no fígado dos animais tratados com AM e Gluc estão associadas com o aumento do índice apoptótico dos hepatócitos, o que comprova a hepatotoxicidade desses compostos. As alterações histopatológicas correlacionam-se como aumento da atividade da peroxidase nos grupos tratados com Gluc e AM, o que sugere maior estresse oxidativo (Das et al 2001). Peroxisomas são organelas ubíquas presentes em praticamente todas as células eucariotas, incluindo eucariotos unicelulares. O estresse oxidativo perturba o compartimento peroxissomal e induz a proliferação de peroxissomas e de genes peroxissomais. É sabido que peroxissomas possui uma variedade de enzimas, incluindo a catalase, envolvidas na degradação de ROS, logo o crescimento de compartimentos peroxissomais poderia ser uma resposta ao estresse oxidativo (Schrader e Fahimi, 2004).

A maior toxicidade de Gluc e AM *in vivo* correlaciona-se com a maior citotoxicidade *in vitro* em células HepG<sub>2</sub>, quando comparada ao AM1. Esses dados estão de acordo com dados prévios obtidos pelo grupo que demonstrou maior citotoxicidade do Gluc e AM em células tumorais de GLC4 (Dzamtika et al. 2006).

Considerando que o AM1 não apresentou alterações histopatológicas apesar de apresentar captação hepática equivalente ao Gluc e somado ao fato do AM1 apresentar menor teor de Sb(III) residual, propomos um possível papel dos metais-traços na hepatotoxicidade, sendo no Gluc devido ao Sb(III) residual e no AM, ao Sb(III) e As(III) residuais. Vale ressaltar que a dose de 80 mg de Sb/kg utilizada no

---

tratamento equivale a cerca de 20 mg de Sb(III) do composto comercial Gluc, considerando a proporção de 24% de Sb(III) residual anteriormente apresentado (Capítulo 1). Estudo de Lynch e colaboradores (1999) mostraram que a administração, em camundongo, do tartarato emético na dose de 18 mg Sb(III)/kg por via IP durante 12 dias acarretou necrose e inflamação no fígado, dados que estão de acordo com nossos resultados e reforçam o nosso modelo de toxicidade induzida pelo Sb(III) residual.

O Gluc mostrou menor captação hepática de Sb que o AM, mas interessantemente apresentou toxicidade equivalente ou superior ao AM apesar de menor concentração de Sb(III), As(III) e Pb. Este fato que outros fatores além do resíduo de Sb(III) poderiam contribuir para a toxicidade do Gluc, como a diferença estrutural entre o Gluc e o AM.

Na obtenção de marcadores bioquímicos séricos de alterações hepáticas, não encontramos diferença significativa entre os grupos, inclusive no grupo tratado com Gluc. Como explicação possível é que a eutanásia dos animais ocorreu três dias após a interrupção do tratamento, o que poderia ser tempo suficiente para haver recuperação parcial do tecido hepático. Um estudo prévio em roedores mostrou um aumento significativo nos níveis séricos de ALT, AST e creatinina, mas na dose de 900 mg de Sb(V)/kg por dia por 30 dias (Henao et al. 2004), que é bem mais alta que àquela utilizada em nossos ensaios.

É interessante notar que os compostos antimoniais AM, AM1 e Gluc, apesar de apresentarem toxicidades diferentes, mostraram eficácia equivalentes na redução da carga parasitária no fígado e baço dos animais. Isto sugere que a variação do teor de Sb(III) residual não influencia significativamente a eficácia destes compostos, o que está de acordo com dados prévios do grupo que relatam eficácia semelhante desses três compostos antimoniais em modelo murino de LC (Dzamtika et al. 2006). Chama a atenção o fato do AM1 apresentar menores alterações histopatológicas no fígado e ser tão eficaz quanto Gluc, apesar do Sb(III) mediar tanto a toxicidade quanto a atividade do antimonial pentavalente.

Como possível explicação, a taxa de liberação de Sb(III) a partir do Gluc poderia ser maior que àquela do AM1. Por outro lado, a maior eficiência de captação do AM pelos macrófagos garantiria sua ação antileishmania.



---

Como resultado importante desta tese, relatamos pela primeira vez que o co-tratamento com AA reduz a hepatotoxicidade do antimoniato de meglumina, evidenciada pela diminuição das alterações histopatológicas, do índice apoptótico e da atividade da peroxidase.

A redução da atividade da peroxidase no tecido hepático com a associação com AA sugere um efeito do AA na redução do estresse oxidativo gerado pelos compostos antimoniais.

O AA, além de promover hepatoproteção, melhorou a eficácia do Gluc no baço, sugerindo uma ação pró-oxidante, o que poderia ser explicado pela redução da concentração intracelular de tióis no parasito como ocorre na sua utilização na resistência de tumores celulares (Chen et al. 2005, Fromberg et al. 2011), tornando o antimonial mais ativo (Goyeneche-Patino et al. 2008). A dose de AA utilizada no estudo foi aproximadamente dez vezes menor que àquela utilizada no tratamento de câncer em associação com compostos arsenicais, que explora a atividade pró-oxidante do AA (Bahlis et al. 2002, Chen et al. 2005, Levine et al. 2011). O AA mostrou duas ações opostas no nosso trabalho: ação antioxidante que reduz os efeitos colaterais advindos do tratamento antimonial e efeito pró-oxidante que aumentou a ação antileishmanial do Glucantime<sup>®</sup> no ensaio de diluição limitante.

#### **4.5- Conclusões do capítulo**

Mostramos que o tratamento de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* com compostos antimoniais sintético (AM) e comercial (Gluc) promove hepatotoxicidade, evienciada por alterações histopatológicas e aumento do índice apoptótico.

A maior ocorrência de alterações hepáticas correlacionou-se com a indução da atividade da peroxidase, uma maior citotoxicidade e produção de ROS em células HepG2, sugerindo como possível causa de hepatotoxicidade, um aumento do estresse oxidativo.

O AM1, com teor de Sb(III) residual menor que Gluc, não promoveu hepatotoxicidade, o que sugere o possível papel do Sb(III) residual na hepatotoxicidade do Gluc.

Gluc foi mais tóxico que o AM, apesar dos menor teores de Sb(III) e de metais traços e da menor velocidade de redução pela cisteína, sugerindo a possível interferência da estrutura do complexo.

O co-tratamento com AA no modelo murino de LV submetido à quimioterapia antimonial pentavalente promoveu redução das alterações hepáticas sem comprometer a eficácia dos antimoniais. O efeito protetor do AA correlacionou-se com a diminuição na indução da atividade da peroxidase.

O uso de antimoniais pentavalentes com baixo teor de Sb(III) residual e o co-tratamento com ácido ascórbico são estratégias promissoras para minimizar os efeitos colaterais mediados pelo estresse oxidativo induzido pela terapia antimonial.

## Capítulo 3: Possível benefício da via oral de administração do antimoniato de meglumina

## **5- Capítulo 3: Possível benefício da via oral de administração do antimoniato de meglumina**

### **5.1- Introdução**

Os antimoniais pentavalentes, apesar de serem utilizados há mais de meio século e terem eficácia comprovada contra as leishmanioses, apresentam limitações como: tratamento de longa duração por via parenteral, toxicidade sistêmica e local durante a aplicação intramuscular, o que requer supervisão médica (Balanã-Fouce et al. 1998; Murray 2000, 2001; Guerin et al. 2002). Todos estes fatores contribuem com o aumento do custo do tratamento e dificuldade de adesão do paciente podendo levar à falha do tratamento e aparecimento de resistência ao fármaco (Guerin et al. 2002, Demicheli et al. 2004, Croft et al. 2006).

Esse quadro explica os esforços desenvolvidos na busca de uma alternativa oral efetiva contra a leishmaniose, em função dos benefícios ao paciente e vantagens econômicas que esta via representa. Apesar da via oral ser considerada a via de administração mais conveniente, há alguns desafios relacionados à adoção da quimioterapia oral: possibilidade de degradação do fármaco no trato gastrointestinal durante a exposição ao pH ácido estomacal e o metabolismo de primeira passagem; ativação precoce do fármaco quando este é um pró-fármaco, baixa absorção resultando em baixa biodisponibilidade e ineficácia do fármaco (Bhattacharya 2010).

Neste capítulo propomos investigar o potencial da via oral de administração desses complexos antimoniais.

Estes dados não serão divulgados pois não foram publicados até o presente momento.

## **6- Conclusão geral**

O presente trabalho da tese de doutorado permitiu avanços importantes na identificação de novas estratégias, e da sua justificativa, para reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia antimonial da leishmaniose visceral.

Como primeira estratégia, validamos o uso do antimoniato de meglumina com menor teor de Sb(III) residual para reduzir a hepatotoxicidade do antimonial.

Como segunda estratégia, mostramos que o co- tratamento com AA permite reduzir o estresse oxidativo e a consequente hepatotoxicidade do Glucantime<sup>®</sup> comercial.

Como terceira estratégia, apontamos a via de administração oral como uma via promissora para o tratamento da LV, principalmente com o antimoniato de meglumina de baixa massa molar.

---

## 7- Referências Bibliográficas

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. Toxicological Profile for Barium and Compounds (*Update*). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. [http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport\\_UpdatedTables\\_Sep2012.pdf](http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport_UpdatedTables_Sep2012.pdf)
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2004. Toxicological Profile for Copper. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. Toxicological Profile for lead (Update). Atlanta, GA: U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service.
4. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. Toxicological Profile for Arsenic(Update). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
5. AlKhawajah, A., Larbi, E. B., Jain, S., Al-Gindan, Y., Abahussain, A. (1992). Subacute toxicity of pentavalent antimony compounds in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 11(4), 283-288.
6. Almeida, O. L. S., Santos, J. B. (2011). Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(3), 497-506.
7. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, 7(5), e35671.
8. Angermüller, S., Fahimi, H. D. (1983). Selective staining of cell organelles in rat liver with 3, 3'-diaminobenzidine. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 31(1A Suppl), 230-232.
9. Aronson, N. E., Wortmann, G. W., Johnson, S. C., Jackson, J. E., Gasser, R. A., Magill, A. J., Alan J.; Endy, Timothy P.; Coyne, Philip E.; Grogl, Max; Benson, Paul M.; Beard, Jeffrey S.; Tally, John D.; Gambel, Jeffrey M.; Kreutzer, Richard D.; Oster, Charles N (1998). Safety and efficacy of intravenous sodium

- 
- stibogluconate in the treatment of leishmaniasis: recent US military experience. *Clinical Infectious Diseases*, 27(6), 1457-1464.
10. Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced drug delivery reviews*, 1;46(1-3), 27-43.
  11. Bahlis, N. J., McCafferty-Grad, J., Jordan-McMurry, I., Neil, J., Reis, I., Kharfan-Dabaja, M., Eckman J, Goodmann M, Fernandez HF, Boise LH e Lee, K. P. (2002). Feasibility and correlates of arsenic trioxide combined with ascorbic acid-mediated depletion of intracellular glutathione for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 8(12), 3658-3668.
  12. Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., Cubria, J. C., Ordóñez, D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology: The Vascular System*, 30(4), 435-443.
  13. Ballou, W. R., Gordon, D., Andujar, J., McClain, J. B., Shanks, G. D., Berman, J., & Chulay, J. (1987). Safety and efficacy of high-dose sodium stibogluconate therapy of American cutaneous leishmaniasis. *The Lancet*, 330(8549), 13-16.
  14. Basselin, M., Denise, H., Coombs, G. H., Barrett, M. P. (2002). Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12), 3731-3738.
  15. Berman, J. D. (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*, 24(4), 684-703.
  16. Berman, J. D., Waddell, D., Hanson, B. D. (1985). Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(6), 916-920.
  17. Bhattacharyya, G. S. (2010). Oral systemic therapy: Not all "win-win". *Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*, 31(1), 1.
  18. Boer, M. L., Alvar, J., Davidson, R. N., Ritmeijer, K., Balasegaram, M. (2009). Developments in the treatment of visceral leishmaniasis.

- 
19. Bohets, H., Annaert, P., Mannens, G., Anciaux, K., Verboven, P., Meuldermans, W., & Lavrijsen, K. (2001). Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(5), 367-383.
  20. Brandon, E. F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. (2003). An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 189(3), 233-246.
  21. Brillault, J., De Castro, W. V., Harnois, T., Kitzis, A., Olivier, J. C., Couet, W. (2009). P-glycoprotein-mediated transport of moxifloxacin in a Calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1457-1462.
  22. Bryceson, A. (2001). A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Tropical Medicine & International Health*, 6(11), 928-934.
  23. Bryceson, A. D. M., Chulay, J. D., Mugambi, M., Were, J. B., Gachihi, G., Chunge, C. N., Muigai, R., Bhatt, S.M., Ho, Spencer, H.C., Meme, J., Anabwani, G. (1985). Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs II. Response to high dosage sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(5), 705-714.
  24. Burguera, J. L., Burguera, M., DE PENA, Y., Lugo, A., Anez, N. (1993). Selective determination of antimony (III) and antimony (V) in serum and urine and of total antimony in skin biopsies of patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimonate. *Trace elements in medicine*, 10(2), 66-70.
  25. Cameron, E., Pauling, L., Leibovitz, B. (1979). Ascorbic acid and cancer: a review. *Cancer Research*, 39(3), 663-681.
  26. Carter, K. C., Baillie, A. J., Alexander, J., & Dolan, T. F. (1988). The therapeutic effect of sodium stibogluconate in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* is organ-dependent. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40(5), 370-373.
  27. Chen, Q., Espey, M. G., Krishna, M. C., Mitchell, J. B., Corpe, C. P., Buettner, G. R., Shacter, E. & Levine, M. (2005). Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to



- 
- tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(38), 13604-13609.
28. Chen, Q., Espey, M. G., Sun, A. Y., Pooput, C., Kirk, K. L., Krishna, M. C., Levine, M. (2008). Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(32), 11105-11109.
29. Chulay, J. D., Fleckenstein, L., Smith, D. H. (1988). Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 82(1), 69-72.
30. Clemens, M. G. (1999). Nitric oxide in liver injury. Hepatology, 30(1), 1-5.
31. Croft, S. L., Sundar, S., Fairlamb, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. Clinical microbiology reviews, 19(1), 111-126.
32. Das, M., Mukherjee, S. B., Shaha, C. (2001). Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Journal of Cell Science, 114(13), 2461-2469.
33. Davidson RN. (1999). Visceral leishmaniasis in clinical practice. Journal of Infections, 39 (2), p. 112-116.
34. Davidson, R. N. (1998). Practical guide for the treatment of leishmaniasis. Drugs, 56(6), 1009-1018.
35. Demicheli, C. Síntese de derivados de antimônio pentavalente utilizados no tratamento de protozooses. Patente concedida no Brasil *PI 9907575-0*, 1999.
36. Demicheli, C., Ochoa, R., da Silva, J. B., Falcão, C. A., Rossi-Bergmann, B., de Melo, A. L., Sinisterra, R.D. Frézard, F. (2004). Oral delivery of meglumine antimoniate- $\beta$ -cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(1), 100-103.
37. Demicheli, C., Ochoa, R., Silva Lula, I., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., Frezard, F. (2003). Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimonate. Applied Organometallic Chemistry, 17(4), 226-231.
38. Demicheli, C.; Frézard, F. Novo processo para preparação de derivados de antimônio. Patente concedida no Brasil *PI 0106305-7*, 2001.

- 
39. De-Oliveira, J. M., Fernandes, A. C., Dorval, M. E. C., Alves, T. P., Fernandes, T. D., Oshiro, E. T., de Oliveira, A. L. L. (2010). Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 43, 188-193.
40. Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(5), 305-318.
41. Desjeux, P., Alvar, J. (2003). Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97(1), 3-15.
42. Dias Costa, J., de Nazareth Meirelles, M., Eduardo Pereira Velloso, C., Porrozz, R. (2007). *Leishmania chagasi*: Cytotoxic effect of infected macrophages on parenchymal liver cells. *Experimental Parasitology*, 117(4), 390-398.
43. Dzamitika, S. A., Falcão, C. A., de Oliveira, F. B., Marbeuf, C., Garnier-Suillerot, A., Demicheli, C., Rossi-Bergmann B., Frézard, F. (2006). Role of residual Sb (III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. *Chemico-Biological Interactions*, 160(3), 217-224.
44. Ephros, M., Bitnun, A., Shaked, P., Waldman, E., Zilberstein, D. (1999). Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(2), 278-282.
45. Fahimi, H. D. (2009). Peroxisomes: 40 years of histochemical staining, personal reminiscences. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(4), 437-440.
46. Fernandes, F. R., Ferreira, W. A., Campos, M. A., Ramos, G. S., Kato, K. C., Almeida, G. G., Correa- Junior, J. D., Melo, M. N., Demicheli, C., Frézard, F. (2013). Amphiphilic antimony (V) complexes for oral treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4229-4236.
47. Ferreira, C S., Martins, P. S., Demicheli, C., Brochu, C., Ouellette, M., Frézard, F. (2003). Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals*, 16(3), 441-446.
48. Ferreira, C.S., de Castro Pimenta, A. M., Demicheli, C., Frézard, F. (2006). Characterization of reactions of antimoniate and meglumine antimoniate with a guanine ribonucleoside at different pH. *Biometals*, 19(5), 573-581.

- 
49. Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A., Siqueira-Neto, J. L. (2012). Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 11-19.
50. Frézard, F., Demicheli, C. (2010). New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(12), 1343-1358.
51. Frézard, F., Demicheli, C., Ribeiro, R. R. (2009). Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*, 14(7), 2317-2336.
52. Frézard, F., Demicheli, C., Ferreira, C. S., Costa, M. A. (2001). Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 913-916.
53. Frézard, F., Martins, P. S., Bahia, A. P. C., Le Moyec, L., de Melo, A. L., Pimenta, A., Salerno M., Silva J.B.B. Demicheli, C. (2008). Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ $\beta$ -cyclodextrin nanoassemblies. *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1), 102-108.
54. Frézard, F., Martins, P. S., Barbosa, M., Pimenta, A., Ferreira, W. A., de Melo, J. E., Demicheli, C. (2008). New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(4), 656-665.
55. Frömberg, A., Gutsch, D., Schulze, D., Vollbracht, C., Weiss, G., Czubyko, F., Aigner, A. (2011). Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(5), 1157-1166.
56. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119(3), 493-501.
57. Giudice, A., Camada, I., Leopoldo, P. T., Pereira, J. M., Riley, L. W., Wilson, M. E., Almeida, R. P. (2007). Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases*, 7(1), 1-12.

- 
58. Gomes dos Reis P. 2010. Toxicidade do arsênio e do antimônio trivalentes: influência da encapsulação em lipossomas e da associação ao ácido ascórbico. Dissertação de mestrado, UFOP, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.
59. Gontijo, B., MLR, C. (2003). Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1), 71-80.
60. González, M. J., Miranda-Massari, J. R., Mora, E. M., Guzmán, A., Riordan, N. H., Riordan, H. D., Román-Franco, A. (2005). Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integrative Cancer Therapies*, 4(1), 32-44.
61. Goodwin, L. G., Page, J. E. (1943). A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochemical Journal*, 37(2), 198.
62. Goyeneche-Patino, D. A., Valderrama, L., Walker, J., Saravia, N. G. (2008). Antimony resistance and trypanothione in experimentally selected and clinical strains of *Leishmania panamensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12), 4503-4506.
63. Griensven, V.J., Balasegaram, M., Meheus, F., Alvar, J., Lynen, L., Boelaert, M. (2010). Combination therapy for visceral leishmaniasis. *The Lancet Infectious diseases*, 10(3), 184-194.
64. Grimaldi, G., Porrozzì, R., Friedrich, K., Teva, A., Marchevsky, R. S., Vieira, F., Paumgarten, F. J. R. (2010). Comparative efficacies of two antimony regimens to treat *Leishmania braziliensis*-induced cutaneous leishmaniasis in *Rhesus macaques* (*Macaca mulatta*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 502-505.
65. Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A. B. D. (2007). Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira Cancerologia*, 53(3), 335-43.
66. Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Bryceson, A. D. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(8), 494-501.
67. Haldar, A. K., Sen, P., Roy, S. (2011). Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular Biology International*, 2011, 1-23.

- 
68. Hansen, C., Hansen, E. W., Hansen, H. R., Gammelgaard, B., Stürup, S. (2011). Reduction of Sb (V) in a human macrophage cell line measured by HPLC-ICP-MS. *Biological Trace Element Research*, 144(1-3), 234-243.
69. Henao, H. H., Osorio, Y., Saravia, N. G., Gómez, A., Travi, B. (2004). Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime® and Pentostam®) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application. *Biomedica*, 24(4), 393-402.
70. Hepburn, N. C., Siddique, I., Howie, A. F., Beckett, G. J., Hayes, P. C. (1994). Hepatotoxicity of sodium stibogluconate therapy for American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 453-455.
71. Ikeda-Garcia, F. A., Lopes, R. S., Ciarlini, P. C., Marques, F. J., Lima, V. M. F., Perri, S. H. V., Feitosa, M. M. (2007). Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Research in Veterinary Science*, 83(1), 105-108.
72. Lecreur, V., Le Thiec, A., Le Meur, A., Amiot, L., Drenou, B., Bernard, M., Lamy, T., Fauchet, R., Fardel, O. (2002). Potassium antimonyl tartrate induces caspase-and reactive oxygen species-dependent apoptosis in lymphoid tumoral cells. *British Journal of Haematology*, 119(3), 608-615.
73. Levine, M., Padayatty, S. J., Espey, M. G. (2011). Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2(2), 78-88.
74. Lewin, K. M., Desjeux, P. (1996). Leishmaniasis Public Health Aspects and Control. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 417-423.
75. Lindoso J. A., Costa J. M., Queiroz I. T., Goto H. (2012). Review of the current treatments for leishmaniasis. *Research and Reports in Tropical Medicine* 3, 69–77.
76. Luna L.G. (1968). Production. In: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: U.S.A. Blakiston Division, McGraw-Hill (ed. 3rd ed):38-39. E 30. Trott, JR. 1961. An evaluation of methods commonly used for the fixation and staining of glycogen. *Journal Histochemical Cytochem*, 9:703-710).
-

- 
77. Lynch, B. S., Capen, C. C., Nestmann, E. R., Veenstra, G., & Deyo, J. A. (1999). Review of subchronic/chronic toxicity of antimony potassium tartrate. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30(1), 9-17.
78. MAPA 2008. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008, Ministério da Agricultura, P.e.A., ed. (Brasília, Diário Oficial da União), p. 24.
79. Marques-da-Silva, C., Chaves, M. M., Chaves, S. P., Figliuolo, V. R., Meyer-Fernandes, J. R., Corte-Real, S., Coutinho-Silva, R. (2011). Infection with *Leishmania amazonensis* upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. *Cellular Microbiology*, 13(9), 1410-1428.
80. Martins, P. S., Ochoa, R., Pimenta, A., Ferreira, L. A., Melo, A. L., da Silva, J. B., Sinisterra, R.D., Demicheli C., Frézard, F. (2006). Mode of action of  $\beta$ -cyclodextrin as an absorption enhancer of the water-soluble drug meglumine antimoniate. *International Journal of Pharmaceutics*, 325(1), 39-47.
81. Martins, P. S., Ribeiro, R. R., Bahia, A. P., M Neto, R. L., Frézard, F., Pimenta, A. M. C, Demicheli, C. (2009). Physicochemical characterization of orally-active meglumine antimoniate/beta-cyclodextrin nanoassemblies: non-inclusion interactions and sustained drug release properties. *Brazilian Journal of Physics*, 39(1A), 223-225.
82. Matés, J. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.
83. Miret, S., Abrahamse, L., de Groene, E. M. (2004). Comparison of in vitro models for the prediction of compound absorption across the human intestinal mucosa. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(7), 598-606.
84. Mitropoulos, P., Konidas, P., Durkin-Konidas, M. (2010). New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(2), 309-322.
85. Morais-Teixeira, E. D., Damasceno, Q. S., Galuppo, M. K., Romanha, A. J., Rabello, A. (2011). The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4), 475-478.

- 
86. Moreira, W., Leprohon, P., Ouellette, M. (2011). Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell death & disease*, 2(9), e201.
87. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63.
88. Murray, H. W. (2000). Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *International Journal of Infectious Diseases*, 4(3), 158-177.
89. Murray, H. W. (2001). Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), 2185-2197.
90. Niklas, J., Noor, F., Heinzle, E. (2009). Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3), 327-336.
91. Oliveira, F. B. D., Schettini, D. A., Ferreira, C. S., Rates, B., Rocha, O. G., Frézard, F., Demicheli, C. (2006). Kinetics of antimony (V) reduction by L-cysteine: pharmacological implications and application to the determination of antimony in pentavalent antimonial drugs. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(8), 1642-1650.
92. Olliaro, P. L., Guerin, P. J., Gerstl, S., Haaskjold, A. A., Rottingen, J. A., Sundar, S. (2005). Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(12), 763-774.
93. OMS 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. In WHO Technical Report Series
94. OMS- Organização Mundial da Saúde. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leish\\_VL\\_Therapy\\_statement.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leish_VL_Therapy_statement.pdf) 11 Aug.09 Madrid International Symposium on advances in visceral leishmaniasis therapy – Statement on the outcome of the meeting.
95. Ouellette, M., Drummel-Smith, J., Papadopoulou, B. (2004). Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, 7(4), 257-266.

- 
96. Pang, K. S. (2003). Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series). *Drug Metabolism and Disposition*, 31(12), 1507-1519.
97. Peters, W. (1981). The treatment of kala-azar--new approaches to an old problem. *The Indian Journal of Medical Research*, 73, 1.
98. Press, B., Di Grandi, D. (2008). Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. *Current Drug Metabolism*, 9(9), 893-900.
99. Qazilbash, M. H., Saliba, R. M., Nieto, Y., Parikh, G., Pelosini, M., Khan, F. B., Giralt, S. (2008). Arsenic trioxide with ascorbic acid and high-dose melphalan: results of a phase II randomized trial. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14(12), 1401-1407.
100. Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., de Jesús, M. N., Marzal, P. C., Tempone, A. G. (2003). Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, 26(4), 550-555.
101. Ribeiro, M. D. C., Coutinho, L. M. B., Hilbig, A. (2004). The role of apoptosis, cell proliferation index, bcl-2, and p53 in glioblastoma prognosis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 62(2A), 262-270.
102. Ribeiro, R. R., Ferreira, W. A., Martins, P. S., Neto, R. L., Rocha, O. G., Le Moyec, L., Frézard, F. (2010). Prolonged absorption of antimony (V) by the oral route from non-inclusion meglumine antimoniate- $\beta$ -cyclodextrin conjugates. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 31(2-3), 109-119.
103. Ridley, R.G. (2003). In *Drug against parasitic diseases*; Failamb, A.H., Ridley, R.G., Vial, H.J., Eds.; UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR): Geneva, Switzerland, 13-21.
104. Roberts, W. L., McMurray, W. J., Rainey, P. M. (1998). Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(5), 1076-1082.
105. Romero, G. A. S., Flores, É. M. D. M., Noronha, E. F., Macêdo, V. D. O. (2003). High frequency of skin reactions in patients with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate contaminated with heavy metals: a comparative approach using historical controls. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(1), 145-149.



- 
106. Salaün, P., Frézard, F. (2013). Unexpectedly high levels of antimony (III) in the pentavalent antimonial drug Glucantime: insights from a new voltammetric approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-14.
  107. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1-88.
  108. Baneth G, Shaw SE 2002. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet parasitol* 106: 315-324.
  109. Moreno J, Alvar J 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18: 399-405.
  110. Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22(3), 659-661.
  111. Sampaio, R. N. R., Takano, G. H. S., Malacarne, A. C. B., Pereira, T. R., Magalhães, A. V. D. (2003). Ineficácia in vivo da terbinafina em leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos C57BL6. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(4).
  112. Santos, D. O., Coutinho, C. E., Madeira, M. F., Bottino, C. G., Vieira, R. T., Nascimento, S. B. Castro, H. C. (2008). Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*, 103(1), 1-10.
  113. Schettini, D. A., Ribeiro, R. R., Demicheli, C., Rocha, O. G., Melo, M. N., Michalick, M. S., Frézard, F. (2006). Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *International Journal of Pharmaceutics*, 315(1), 140-147.
  114. Schrader, M., Fahimi, H. D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), 383-393.
  115. Sereno, D., Cavaleyra, M., Zemzoumi, K., Maquaire, S., Ouaisi, A., Lemesre, J. L. (1998). Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12), 3097-3102.
  116. Silva AV, Paula AA, Cabrera MA, Carreira JC 2005. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. *Cad Saude Publica* 21: 324-328.
  117. Silva Junior J. 2001. Relatório Técnico Antimoniato de meglumina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34, p.103-105.

- 
118. Singh, S., Rana, S. V. S. (2007). Amelioration of arsenic toxicity by L-Ascorbic acid in laboratory rat. *Journal of Environmental Biology*, 28(2), 377.
  119. Singh, S., Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10(6), 307-315.
  120. Sohini, S., Rana, S. V. S. (2007). Protective effect of ascorbic acid against oxidative stress induced by inorganic arsenic in liver and kidney of rat. 2007. *Indian Journal of Experiment Biology*, v 45, p. 371-375.
  121. Soini, Y., Pääkkö, P., Lehto, V. P. (1998). Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *The American Journal of Pathology*, 153(4), 1041.
  122. Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A. , Sindermann, H. (2004). Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(9), 1266-1272.
  123. Sundar, S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*, 6(11), 849-854.
  124. Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Berman, J. (2002). Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 347(22), 1739-1746.
  125. Titus, R. G., Marchand, M., Boon, T., Louis, J. A. (1985). A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology*, 7(5), 545-555.
  126. Valladares, J. E., Atberola, J., Esteban, M., Arboix, M. (1996). Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Veterinary Record*, 138, 181-183.
  127. Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R. A. I., Maes, L., Cos, P. (2011). *Leishmania* macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 337-351.
  128. Vanlerberghe, V., Diap, G., Guerin, P. J., Meheus, F., Gerstl, S., Stuyft, P., Boelaert, M. (2007). Drug policy for visceral leishmaniasis: a cost-effectiveness analysis. *Tropical Medicine & International Health*, 12(2), 274-283.

129. Voisin, E. M., Ruthsatz, M., Collins, J. M., & Hoyle, P. C. (1990). Extrapolation of animal toxicity to humans: interspecies comparisons in drug development. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 12(2), 107-116.
130. Wang, N. T., Lin, H. I., Yeh, D. Y., Chou, T. Y., Chen, C. F., Leu, F. C., Hu, R. T. (2009). Effects of the antioxidants *Lycium barbarum* and ascorbic acid on reperfusion liver injury in rats. In *Transplantation Proceedings*, 41(10),. 4110-4113.
131. Wenzel, U., Nickel, A., Kuntz, S., Daniel, H. (2004). Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis*, 25(5), 703-712.
132. Wilhelm, J., Vytášek, R., Ošťádalová, I., Vajner, L. (2009). Evaluation of different methods detecting intracellular generation of free radicals. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 328(1-2), 167-176.
133. Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(8), 1035-1042.
134. Wyllie, S., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H. (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39925-39932.
135. Wyllie, S., Fairlamb, A. H. (2006). Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochemical Pharmacology*, 71(3), 257-267.

## **8- Anexo**

**Anexo 1:** Artigo submetido.

# Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid

AQ: au Kelly C. Kato,<sup>a</sup> Eliane Morais-Teixeira,<sup>b</sup> Priscila G. Reis,<sup>a</sup> Neila M. Silva-Barcellos,<sup>c</sup> Pascal Salaün,<sup>d</sup> Paula P. Campos,<sup>e</sup> José Dias Corrêa-Junior,<sup>f</sup> Ana Rabello,<sup>b</sup> Cynthia Demicheli,<sup>g</sup> Frédéric Frézard<sup>a</sup>

▶ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Pampulha, Belo Horizonte, Brazil<sup>a</sup>; Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Barro Preto, Belo Horizonte, Brazil<sup>b</sup>; CiPharma-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil<sup>c</sup>; School of Environmental Sciences, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom<sup>d</sup>; Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Pampulha, Belo Horizonte, Brazil<sup>e</sup>; Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Pampulha, Belo Horizonte, Brazil<sup>f</sup>; Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Pampulha, Belo Horizonte, Brazil<sup>g</sup>

AQ: A

**Pentavalent antimonial drugs such as meglumine antimoniate (Gluantime [Glu; Sanofi-Aventis, São Paulo, Brazil]) produce severe side effects, including cardiotoxicity and hepatotoxicity, during the treatment of leishmaniasis. We evaluated the role of residual Sb(III) in the hepatotoxicity of meglumine antimoniate, as well as the protective effect of the antioxidant ascorbic acid (AA) during antimonial chemotherapy in a murine model of visceral leishmaniasis. BALB/c mice infected with *Leishmania infantum* were treated intraperitoneally at 80 mg of Sb/kg/day with commercial meglumine antimoniate (Glu) or a synthetic meglumine antimoniate with lower Sb(III) level (MA), in association or not with AA (15 mg/kg/day), for a 20-day period. Control groups received saline or saline plus AA. Livers were evaluated for hepatocytes histological alterations, peroxidase activity, and apoptosis. Increased proportions of swollen and apoptotic hepatocytes were observed in animals treated with Glu compared to animals treated with saline or MA. The peroxidase activity was also enhanced in the liver of animals that received Glu. Cotreatment with AA reduced the extent of histological changes, the apoptotic index, and the peroxidase activity to levels corresponding to the control group. Moreover, the association with AA did not affect the hepatic uptake of Sb and the ability of Glu to reduce the liver and spleen parasite loads in infected mice. In conclusion, our data supports the use of pentavalent antimonials with low residue of Sb(III) and the association of pentavalent antimonials with AA, as effective strategies to reduce side effects in antimonial therapy.**

AQ: B

**A**t the beginning of the last century, Gaspar Vianna, pioneer researcher in the treatment of leishmaniasis, reported the efficacy of antimony(III) potassium tartrate (tartar emetic) for treatment of leishmaniasis (1). The less toxic pentavalent antimony [Sb(V)] complexes, including meglumine antimoniate (Gluantime [Glu]), were introduced for the therapy of leishmaniasis from the 1940s. Even though pentavalent antimonials are still the first-line drugs in several countries against all forms of leishmaniasis, their use in the clinical setting has several limitations (2, 3). These compounds have to be given parenterally, daily, for at least 3 weeks (typically, 20 mg of Sb/kg/day for 20 to 30 days). Antimony therapy is often accompanied by local pain during intramuscular injection and by severe side effects that include cardiotoxicity, pancreatitis, hepatotoxicity, and nephrotoxicity (4–8). As consequences, careful medical supervision is required, and compliance problems are common.

AQ: C

The mechanisms involved in the toxicity of pentavalent antimonials are not fully elucidated. However, it is generally accepted that Sb(III), either present as residue in pentavalent antimonials (9) or produced in the tissues through reduction (10), may be responsible for their side effects and antileishmanial action (11). Studies of the mechanism of cytotoxicity of the trivalent tartar emetic drug suggest that Sb(III) compromises thiol homeostasis through depletion of intracellular glutathione and inhibition of glutathione reductase (12, 13). Then, Sb(III) enhances oxidative stress and leads to apoptosis through increase of reactive oxygen species (ROS) (13–15). The toxicity of some batches of pentava-

lent antimonial drug has also been attributed to contamination with As and Pb (16).

Recently, two new synthetic processes were proposed for meglumine antimoniate (17). One of these methods used  $\text{KSb}(\text{OH})_6$  as a source of antimony, instead of  $\text{SbCl}_5$  in the commercial process for Glu. This resulted in a more simple method and a final product that exhibited lower *in vitro* cytotoxicity, compared to Glu (18). It has been suggested that this synthetic meglumine antimoniate may be less toxic *in vivo* than Glu (11).

Ascorbic acid (AA), known as vitamin C, is an important antioxidant and ROS scavenger which is associated to arsenicals in the treatment of cancer (19–21). Among its several benefits, AA can increase the cytotoxicity of As(III) against multidrug-resistant cells, presumably through reduction of glutathione intracellular concentration (22, 23). AA was also found to reduce the toxicity of arsenicals in rats through the inhibition of oxidative stress (24, 25). Considering the possible role of Sb(III) in the toxicity of pentavalent antimonials and the chemical similarities between Sb(III) and As(III), we hypothesized that AA

Received 15 July 2013 Returned for modification 16 September 2013

Accepted 27 October 2013

Published ahead of print 4 November 2013

Address correspondence to Frédéric Frézard, frezard@icb.ufmg.br.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.01499-13

may reduce the toxicity of pentavalent antimonials during chemotherapy of leishmaniasis.

In the present study, the use of a pentavalent antimonial drug with reduced Sb(III) content and the association of these drugs with AA were investigated as novel strategies for improved therapy of leishmaniasis. More specifically, commercial and synthetic forms of meglumine antimoniate differing in their amount of Sb(III) were compared for their hepatotoxicity and efficacy in a murine model of visceral leishmaniasis (VL). AA also was evaluated for its hepatoprotective effect during pentavalent antimonial chemotherapy and its interference with the drug antileishmanial efficacy.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** A commercial sample of meglumine antimoniate (Glucantime [Glu]; 5-ml vials at 300 mg/ml, batch 6050 [Sanofi-Aventis, São Paulo, Brazil]) was obtained from the Brazilian Ministry of Health. Ascorbic acid (5-ml vials at concentration of 100 mg/ml; batch 10080785) was obtained from Hypofarma (Ribeirão das Neves, MG, Brazil). *N*-Methyl-*D*-glucamine (NMG; 98%), bromopyrogallol red (BPR), and antimony(III) potassium tartrate (tartar emetic) were obtained from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). Potassium hexahydroxoantimoniate [K<sub>3</sub>Sb(OH)<sub>6</sub>] was obtained from Fluka Chemie GmbH (Switzerland). Synthetic meglumine antimoniate (MA) was obtained from the reaction of NMG with K<sub>3</sub>Sb(OH)<sub>6</sub>, as previously described (17). The total antimony concentration in MA and Glu, as determined by atomic absorption spectroscopy, was ca. 30% (wt/wt).

**Trace metal analysis in pentavalent antimonials.** The traces of Pb and As were assayed in the antimonial drugs using a Perkin-Elmer NEXION 300 ICP-MS apparatus. The procedures used to determine Sb(III) were described in detail previously (9, 18). The photometric method is based on the specific interaction of Sb(III) with the chromogen BPR. The absorbance of BPR at 560 nm decreases proportionally to the amount of Sb(III) in the analyte solution, as a consequence of the formation of a 1:1 BPR-Sb(III) complex. Briefly, 0.5 ml of analyte solution was prepared from 0.1 ml of 0.1 M phosphate, 0.01 ml of 5% (wt/vol) tartrate, 0.05 ml of 350 μM BPR solution in a 1:1 water-ethanol (vol/vol) mixture and 0.34 ml of water. The pH was then adjusted to 6.8 by using sodium hydroxide. The absorbance was registered at 560 nm before ( $A_0$ ) and after ( $A_m$ ) adding 5 μl of the sample to be analyzed. For each experiment, a calibration curve was established by using tartar emetic as the source of Sb(III) and plotting the difference in the absorbance ( $A_0 - A_m$ ) as a function of Sb(III) concentration.

The voltammetric method is based on anodic stripping voltammetry at a gold wire electrode and was described in detail recently (9). The detection technique was a square wave in 1 mM HCl using a deposition potential of  $-0.6$  V (versus  $3.4$  Ag/AgCl/KCl). Prior to the detection, the Glu solution was diluted in alkaline conditions (10 mM NaOH) to avoid the loss of Sb(III). Overall, Glu was diluted 10<sup>7</sup>-fold. Similarly, MA powder was first dissolved in 10 mM NaOH to give a solution of 6.1 μg/ml before being diluted further 500 times in the voltammetric cell. In both cases (MA powder and Glu), determination was made by the method of standard additions.

**Animals and parasites.** BALB/c mice (female, 4 to 6 weeks old, 18 to 22 g) were obtained from the Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz (CPqRR; Belo Horizonte, MG, Brazil). Free access was allowed to standard diet and tap water was supplied *ad libitum*. *Leishmania infantum* promastigotes of strain MHOM/BR/70/BH46, originally obtained from the CPqRR, were maintained *in vitro* at 22 ± 1°C in Schneider's medium supplemented with 10% bovine fetal serum by serial subcultures after every 48 to 72 h.

**Infection of animals and treatment protocol.** BALB/c mice were inoculated through the tail vein with 2 × 10<sup>7</sup> of *L. infantum* promastigotes/200 μl, obtained after 8 days of culture growth. Infected animals were

divided into six groups ( $n = 7$ ), and treatment was initiated 7 days after infection with the following preparations given daily intraperitoneally (i.p.) for 20 days: (i) Glu group, Glu at 80 mg of Sb/kg/day; (ii) MA group, MA at 80 mg of Sb/kg/day; (iii) Glu + AA group, Glu at 80 mg of Sb/kg/day and ascorbic acid at 15 mg/kg/day given 15 min before antimonial drug; (iv) MA + AA group, MA at 80 mg of Sb/kg/day and ascorbic acid at 15 mg/kg/day; (v) AA group, ascorbic acid at 15 mg/kg/day; and (vi) saline group, isotonic saline.

The choice of AA dose was based on the 250-mg/kg dose given daily by oral route which promoted hepatoprotection in rats exposed for 30 days to arsenite trioxide (24). Conversion of the oral dose to an i.p. dose was made, considering that an oral dose of 250 mg/kg would produce a peak plasma concentration close to that of an i.p. dose of 8 mg/kg in rats (26), which in turn would be equivalent to 16 mg/kg in mice.

Animals were sacrificed on day 30 postinfection by cervical dislocation after ketamine-xylazine anesthesia. Experiments were carried out according to the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and received approval from the Ethics Committee in Animal Experimentation of the CPqRR (protocol L-0024/8).

**Determination of parasite burden.** Three days after the interruption of treatment, the number of viable parasites at the site of infection was determined using the quantitative limiting dilution assay (27) with the following modifications. Briefly, organs were weighed and fragmented, and a tissue homogenate was obtained in 1 ml of Schneider's medium supplemented with 10% bovine fetal serum and 1 ml of a solution containing 100 U of penicillin/ml and 100 mg of streptomycin/ml at pH 7.0. Each tissue homogenate was serially diluted (10-fold) into 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc; Nunc). Samples, in triplicate, were incubated at 26°C for 10 days. The wells containing motile promastigotes were identified with an inverted microscope (Axiovert 25; Zeiss), and the parasite burden was determined from the highest dilution at which promastigotes had grown after 10 days of incubation, i.e., the parasite burden = 10<sup>highest dilution</sup>. Data are presented as the parasite burden per milligrams of organ.

**Determination of antimony in the liver.** Antimony was determined in the liver as previously described (28) using graphite furnace atomic absorption spectroscopy (Analyst AA600; Perkin-Elmer). The livers were recovered, homogenized, and digested with nitric acid in a dry block MA 4004 (Marconi, Sao Paulo, Brazil). The analytical method for the determination of Sb in the liver was validated and showed suitable levels of precision (coefficient of variation < 5%), accuracy (80 to 120% analyte recovery), and linearity (range, 10 to 180 μg of Sb/liter). The quantification limit of the analytical method was 0.93 μg of Sb/g of wet organ.

**Microscopic alterations.** Heart, liver, kidney, pancreas, and spleen specimens were fixed in 10% buffered formalin solution. After 24 h, the fragments were put in 70% alcohol, dehydrated in graded ethanol crescent solutions to pure ethanol, and embedded in paraffin for routine histological protocol. Then, 6-μm tissue sections were obtained using a microtome and stained by hematoxylin and eosin (H&E) for general histological study (29). The periodic acid-Schiff (PAS) technique was used for the identification of glycogen in the liver section (30).

The liver parenchyma were evaluated under optical microscopy in order to compare the main structural damage among the different treatments. Ten fields of each mouse slide were randomly analyzed using ×40 and ×10 objective lenses. The images were segmented, and the averages of the light areas were evaluated. The images were obtained by digital camera (Q-Color 3; Olympus) attached to Olympus BX41 microscope and processed using the software Image Pro-Plus.

**Peroxidase activity in liver.** The peroxidase activity was measured as a marker of oxidative stress using the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) technique (31). Ten fields of each slide were analyzed using ×60 and ×10 objective lenses in order to obtain relative labeling average for each treatment (32, 33). Images were obtained using the equipment and software described above.



**Apoptosis in the liver.** Apoptotic cells were first detected by the observation of cell morphology changes and counted to estimate the apoptotic event, as previously described (34, 35). The analysis was performed on scanned images with a  $\times 40$  panchromatic objective lens, selecting the central regions, and avoiding necrosis areas, using the software Sigma Scan Pro 5 imaging program. Apoptosis was further evaluated semiquantitatively by the TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) method (36) in paraffin-embedded sections mounted on glass slides using a commercial kit (FragEL DNA fragmentation detection kit; Colorimetric-Calbiochem), according to the manufacturer's instructions.

Cells were considered positive when they showed strong nuclear staining, recognized by the presence of dark brown lumps and at least one of the following morphological criteria: (i) anoikis (cell shrinkage with loss of adhesion with adjacent cells), (ii) nuclear condensation (condensed chromatin, sometimes partially permeating the nuclear membrane forming crescent figures), (iii) fragmentation of the nuclear and cytoplasmic membrane (without karyorrhexis or rupture), or (iv) formation of apoptotic bodies resulting from cell fractionation. Positive hepatocytes were then counted blindly, and results were expressed as a percentage of the total hepatocytes, excluding the surrounding massive necrosis lesion. The apoptotic index, i.e., the total number of cells with apoptosis/total number of cells  $\times 100$ , was determined in 15 fields per slide.

**Statistical analysis.** Comparison of the results obtained between different experimental groups was performed using Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's multiple comparison test) or Mann-Whitney test in the case of data with non-normal distribution. Comparison between normally distributed data was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post test. Differences with  $P$  values of  $<0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

**Sb(III) content in pentavalent antimonial compounds.** Two different forms of meglumine antimoniate were evaluated: the commercial form (Glu) and meglumine antimoniate (MA) synthesized from  $\text{KSb(OH)}_6$  (17). Trace metal analysis did not show detectable levels of Pb ( $<2.5 \mu\text{g/g}$ ) or As ( $<1.5 \mu\text{g/g}$ ) in either Glu or MA. On the other hand, residual Sb(III) could be detected by two different methods: a recently developed voltammetric method (9) and a photometric method based on the specific interaction of Sb(III) with BPR chromogen (18). Although Glu and MA have similar total Sb levels (30% [wt/wt]), Glu had a higher content of Sb(III) compared to MA. Interestingly, Sb(III) showed much higher availability in the voltammetric than in the photometric assay. According to the voltammetric method, Glu and MA showed, respectively,  $24.1\% \pm 0.4\%$  and  $16.3\% \pm 0.7\%$  of Sb(III) in relation to total Sb. In agreement with our previous report (18), the photometric method showed Sb(III) proportion of  $0.068\% \pm 0.002\%$  in Glu and did not detect significant level of Sb(III) in MA (proportion  $< 0.007\%$ ).

**Antileishmanial activity and hepatotoxicity of pentavalent antimonial compounds in a murine model of visceral leishmaniasis.** BALB/c mice experimentally infected with *L. infantum* underwent chemotherapy with Glu or MA at the same dose of total antimony of 80 mg/(kg day) for 20 days by the i.p. route. Three days after the end of treatment, the animals were sacrificed, and the parasite burdens were evaluated in the liver and spleen. As shown in Fig. 1, significant reductions of liver and spleen parasite loads were observed in the groups treated with both antimonial drugs compared to the control group treated with saline. No significant difference in parasite load was encountered between Glu and MA groups. In accordance with this result, similar concentra-

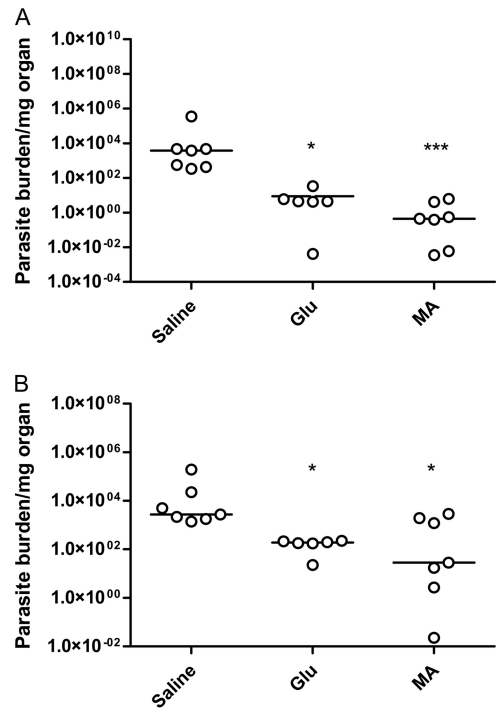


FIG 1 Parasite loads in the livers (A) and spleens (B) of BALB/c mice infected with *L. infantum* after 20 days of treatment with commercial (Glu) or synthetic meglumine antimoniate (MA) (80 mg of Sb/kg/day) or saline by the i.p. route. The data are shown as dot plots, and lines correspond to the median of each group ( $n = 6$  to 7). \*,  $P < 0.05$  (Kruskal-Wallis, followed by Dunn's multiple-comparison post test).

tions of Sb were found in the livers of mice after treatment with Glu and MA ( $4.2 \pm 1.0$  versus  $4.9 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$  of wet liver).

The hearts, kidneys, pancreases, spleens, and livers were evaluated for histopathological changes after treatment, and comparison was also made between infected and noninfected control groups. Heart, kidney, pancreas, and spleen samples did not show significant histological changes upon treatment with Glu or MA (data not shown). On the other hand, histopathological changes were observed in the liver. As illustrated in Fig. 2D, the hepatocytes of the Glu group showed vacuolization and granularity in contrast to those of control and MA groups. Figure 3A shows the result of quantification of lucent areas, indicating a significant increase after treatment with Glu. Since PAS evaluation was negative (data not shown), this change could be attributed to alteration in water homeostasis, which may be caused by free radicals. Further evidence of hepatotoxicity in Glu group was obtained from the increase of TUNEL-positive hepatocytes (Fig. 2A) and of the apoptotic index (Fig. 3B).

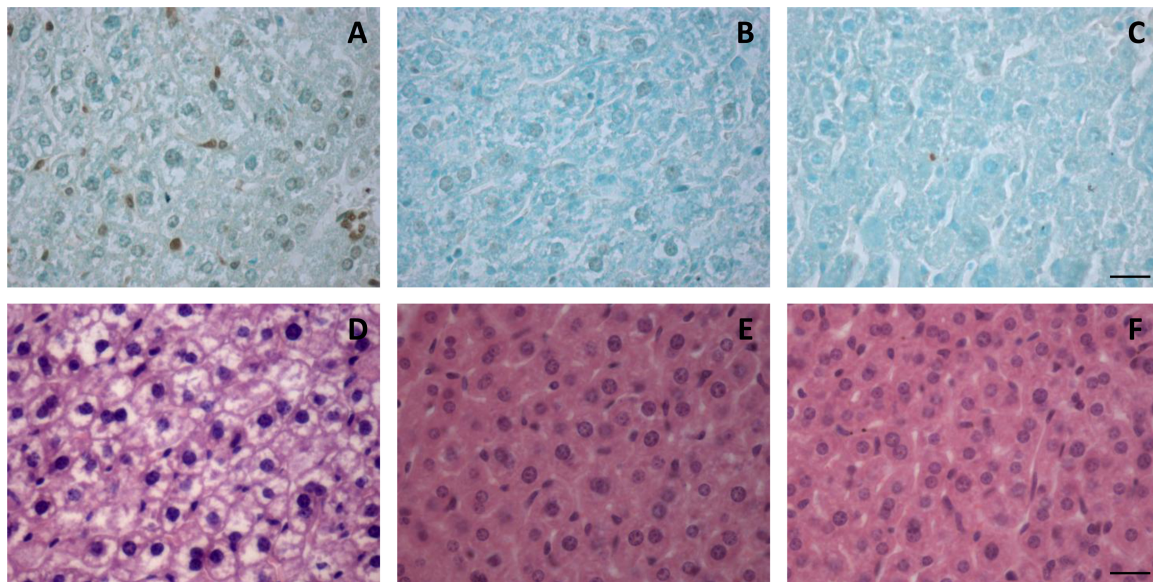
It is noteworthy that the group treated with MA, in contrast to Glu group, did not show significant histological changes and increases in apoptotic activity (Fig. 2B, 2E, and 3B) compared to the control. These data suggest that Sb(III) present at a higher level in Glu is responsible for the hepatotoxicity.

In accordance with this model, treatment with Glu, but not MA, significantly increased the peroxidase activity in the hepatic tissue, as evidenced by the greater level of conversion of DAB substrate (Fig. 3C). These data suggest an increased oxidative stress in the liver upon treatment with Glu.

FI

F2

F3



**FIG 2** Histopathology (D to F) and apoptosis (A to C) analysis in the livers of *L. infantum*-infected BALB/c mice treated as follows: A and D, Glu, given i.p. at 80 mg of Sb/kg/day; B and E, MA, given i.p. at 80 mg of Sb/kg/day; or C and F, saline, given i.p. Histology was evaluated by H&E staining. Apoptosis was assessed by TUNEL. Cells were considered positive when they showed a strong nuclear staining recognized by the presence of dark brown lumps and morphological changes characteristic of apoptosis (see Materials and Methods for details). Bar, 20  $\mu$ m.

**Hepatoprotective effect of ascorbic acid in mice treated with Glu.** AA was evaluated in association with Glu for its ability to reduce hepatotoxicity in the murine model of VL. An experimental group received Glu at 80 mg of Sb/kg plus AA at 15 mg/kg daily for 20 days, and comparison was made with experimental groups treated with either Glu, AA, or saline. As shown in Fig. 4, cotreatment with AA (the Glu+AA group) reduced the lucent area of hepatocytes (Fig. 4A) and the apoptotic index (Fig. 4B) to an extent similar to that observed in saline-treated animals. The reduction of oxidative stress following cotreatment with AA was supported by the decrease of peroxidase activity compared to treatment with Glu alone (Fig. 4C).

In order to verify that the reduced histological alterations in Glu+AA group were not due to a lower uptake of Sb in the liver, the amount of Sb in the liver was compared between the Glu and the Glu+AA groups. A similar value of  $\sim 4 \mu$ g of Sb/g of wet tissue was found in both groups.

**Interference of ascorbic acid with the antileishmanial efficacy of Glu.** Since antimonial drugs seem to exert their activity against *Leishmania* parasite through the induction of oxidative stress (12, 37, 38), it was also important to evaluate the level of interference of the antioxidant AA on the efficacy of Glu. As shown in Fig. 5, the extent of parasite suppression in the liver did not differ significantly between the Glu+AA and the Glu groups. On the other hand, the association of AA with Glu improved the efficacy of the antimonial drug with regard to parasite suppression in the spleen. Thus, cotreatment with AA slightly increased the effectiveness of Glu in this VL model. In the case of MA, cotreatment with AA had no significant effect on the parasite suppressions in both the liver and the spleen (data not shown).

## DISCUSSION

The present study reports for the first time a murine model of Glu-induced hepatotoxicity, based on histopathological changes

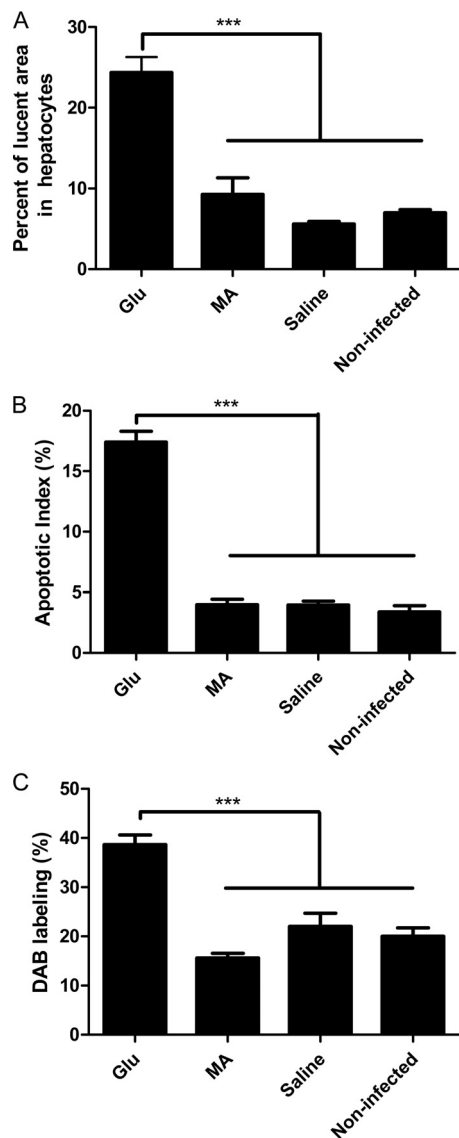
and the increase of apoptotic index of hepatocytes. The observed changes are consistent with previous reports of histological alterations in the liver of nonhuman primate (39), elevation of serum level of hepatic enzymes (2–4), and hepatic failure (5) during pentavalent antimonial chemotherapy. The fact that among the different organs evaluated only the liver showed significant histopathological changes may be explained by the pharmacokinetics of meglumine antimoniate leading to elevated concentration of Sb in the liver (40).

Considering that toxic As and Pb metals were not detected by ICP-MS in the antimonial drugs and that MA with lower Sb(III) residue generated virtually no hepatotoxicity, one can reasonably assume that the hepatotoxicity of Glu is due to residual Sb(III) and its higher bioavailability from this antimonial compound. The apparently lower bioavailability of Sb(III) from MA is consistent with our previous study (18) showing a much lower cytotoxicity of this compound against a tumor cell line compared to Glu.

The proposal that residual Sb(III) in Glu promoted hepatotoxicity is consistent with the high dose of Sb(III) administered, which corresponds to  $\sim 20$  mg of Sb(III) per kg of body weight, based on 24% proportion of antimony under the trivalent form. Indeed, previous study of the subchronic toxicity of antimony(III) potassium tartrate in mice by the i.p. route revealed hepatocellular necrosis following 12 daily doses of 18 mg of Sb(III)/kg (41).

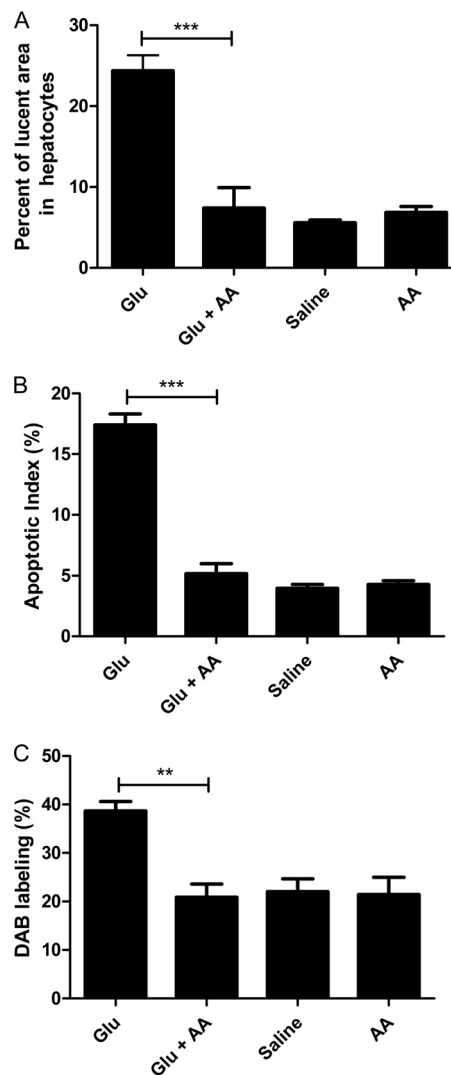
The discrepancy between Sb(III) concentrations determined by the different analytical methods is probably due to a combination of several experimental and/or chemical factors that promote a relatively strong complexation of Sb(III) to the meglumine antimoniate matrix in the photometric assay compared to the voltammetric assay: a higher pH value (pH 6.8 versus 3.2 for voltammetry), a much lower dilution factor for the BPR method ( $10^2$  versus  $10^7$ ), and a higher ionic strength (20 versus 1 mM). These parameters (pH, dilution factor, and ionic strength) were all previously shown to have a significant





**FIG 3** Effect of treatment of *L. infantum*-infected BALB/c mice with commercial (Glu) or synthetic (MA) meglumine antimoniate using different liver parameters: A, lucent area in hepatocytes; B, apoptotic index of hepatocytes; and C, peroxidase activity. Mice were treated with Glu or MA (80 mg of Sb/kg/day) or saline for 20 days by the i.p. route. Noninfected mice receiving saline were also used as controls. The data are means  $\pm$  the standard errors of the mean (SEM;  $n = 3$  to 7). \*\*\*,  $P < 0.001$  (one-way ANOVA with Bonferroni post test).

influence on the level of Sb(III) determined in Glu (9). In that study, the amount of Sb(III) detected was shown to decrease markedly at higher pH, presumably because of pH-induced change in the chemical equilibrium of antimony complex(es) in solution. In addition, although the sample was diluted up to  $10^8$ -fold at neutral pH ( $\sim 6$ ), Sb(III) was still present as a complex, highlighting the strong complexation constant between Sb(III) and meglumine/meglumine antimoniate ligand (9). In the present work, the BPR assay is based on the competition between BPR and the meglumine/meglumine antimoniate ligand for Sb(III) binding. Thus, the much lower concentrations of Sb(III) detected by this method may be attributed



**FIG 4** Influence of AA on the liver parameters of *L. infantum*-infected BALB/c mice treated or not with commercial meglumine antimoniate (Glu). The liver parameters measured included the percentage of lucent area in the hepatocytes (A), the apoptotic indices of the hepatocytes (B), and the peroxidase activity (C). Mice were treated with Glu (80 mg/kg/day), AA (15 mg/kg/day), Glu+AA, or saline alone for 20 days by the i.p. route. Data are means  $\pm$  the SEM ( $n = 3$  to 7). \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one-way ANOVA with Bonferroni post test).

a relatively high pH value (6.8) and low dilution factor, which favored strong complexation of Sb(III) with the meglumine/meglumine antimoniate ligand and consequently decreased the amount of Sb(III)-BPR complex.

The fact that the amount of Sb(III) detected by the photometric method is at least 10-fold higher in Glu than MA, whereas it is only 1.5-fold higher by voltammetry, indicates that the pH and dilution conditions of the photometric assay promoted the release of Sb(III) more effectively from Glu than MA. This suggests that Sb(III) is more readily available from Glu than MA at neutral pH. A possible explanation is that the high-affinity ligand for Sb(III) may be saturated in Glu but not in MA.

The induction of peroxidase activity in the livers of mice treated with Glu is also in agreement with the role of Sb(III) in

AQ:J

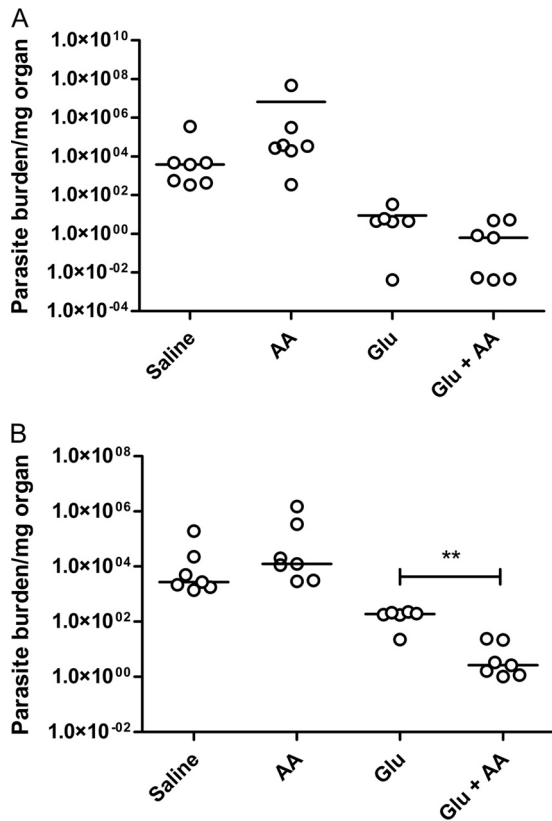


FIG 5 Parasite loads in the liver (A) and spleen (B) in BALB/c mice infected with *L. infantum* after 20 days of treatment with Glu (80 mg of Sb/kg/day) in the presence or absence of AA (15 mg/kg/day) by the i.p. route. The data are shown as dot plots, and lines correspond to the median of each group ( $n = 6$  to 7). \*\*,  $P < 0.01$  (Mann-Whitney test).

the mechanism of toxicity of this pentavalent antimonial drug (11, 18). Indeed, the interference of Sb(III) with the thiol homeostasis (13) results in the increase of ROS production, oxidative stress, and the induction of peroxidase activity and apoptosis (42, 43).

It is generally accepted that pentavalent antimonials are prodrugs that suffer reduction *in vivo* from Sb(V) to Sb(III) (10, 11). However, the recent observation that Glu contains high amounts of residual Sb(III) (9) led us to propose an alternative model, in which meglumine antimoniate may act as molecular carrier of Sb(III) and release it specifically in the acidic intracellular compartment where *Leishmania* parasite resides. Both models assume that Sb(III) is the final active form against the parasite, resulting in depletion of intracellular reduced thiols and enhanced susceptibility of the parasite to oxidative stress (12). Considering that Sb(III) mediates both the antileishmanial action and the toxicity of pentavalent antimonials, one may wonder why MA is active but apparently not toxic. A possible explanation for this is the selectivity of Sb(III) release that may occur in the acidic parasitophorous vacuoles of macrophages but to a lesser extent in the hepatocytes. This interpretation is also consistent with the finding that pentavalent antimonials are active against axenic amastigotes grown at pH 5.5 but relatively inactive against *Leishmania* promastigotes grown at pH 7 (12).

The demonstration that cotreatment with AA protects the

liver against pentavalent antimonial drug toxicity is an important contribution of the present work. This effect may be attributed to the ability of AA to act as secondary defense against oxidative stress. Although a similar effect of AA was previously reported in the case of As(III)-based drug (22, 23), this is the first demonstration of a beneficial effect of AA for a metalloid drug in the pentavalent state. These data strongly suggest that cotreatment with AA may be able to reduce side effects in antimonial chemotherapy. Even though the demonstration of the protective effect of AA is limited to the liver, we expect that in future studies this effect will be extended to other critical organs such as the heart, pancreas, and kidney.

Surprisingly, AA was found to improve the antileishmanial efficacy of Glu. As a possible explanation, AA may reduce the intracellular thiol concentration of *Leishmania* parasite, as previously reported in multidrug-resistant tumor cells (20, 24), turning the antimonial drug more active (44). One should also consider that AA may exert either an antioxidant or a pro-oxidant activity, depending on the concentration and experimental conditions (45). It is noteworthy that the dose of AA used in our study was ~10-fold lower than the effective dose of AA in the treatment of multiple myeloma in combination with arsenic trioxide, which exploits AA pro-oxidant activity (19, 20). Thus, we suggest here the coexistence two opposite actions of AA that may take place in distinct cellular compartments: an antioxidant action reducing the drug side effects and a pro-oxidant action enhancing the drug efficacy. In conclusion, our data support the use of pentavalent antimonials with low residue of Sb(III) and the association of pentavalent antimonials with AA as effective strategies for minimizing the side effects mediated by oxidative stress during antimonial therapy.

AQ: K

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Brazilian agencies CNPq (303046/2009 and a studentship), FAPEMIG (PPM-00382-11, REDE 40/11, and CBB-APQ-01123-09), and CAPES (2447/2009 and a studentship) for financial support. F.F. and C.D. are recipients of a research fellowship from CNPq.

## REFERENCES

- Vianna G. 1912. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. Ann. 7th Cong. Bras. Med. Cirurg. 4:426–428.
- Marsden PD. 1985. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18:187–198. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821985000300011>.
- Berman JD. 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin. Infect. Dis. 24:684–703. <http://dx.doi.org/10.1093/clind/24.4.684>.
- Hepburn NC, Siddique I, Howie AF, Beckett GJ, Hayes PC. 1994. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate in leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88:453–455. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90432-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(94)90432-4).
- Oliveira AL, Brustoloni YM, Fernandes TD, Dorval ME, Cunha RV, Bóia MN. 2009. Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. Trop. Doct. 39:180–182. <http://dx.doi.org/10.1258/td.2008.080369>.
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA. 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Trop. 118:87–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>.
- Mlika RB, Hamida MB, Hammami H, Jannet SB, Badri T, Fenniche S, Mokhtar I. 2012. Should we continue to indicate meglumine antimoniate

- as first-line treatment for cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Dermat. Ther.* 25:615–618. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01522.x>.
8. Wise ES, Armstrong MS, Watson J, Lockwood DN. 2012. Monitoring toxicity associated with parenteral sodium stibogluconate in the day-case management of returned travelers with New World cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1688. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001688>.
  9. Saláün P, Frézard F. 2013. Unexpectedly high levels of antimony (III) in the pentavalent antimonial drug Glucantime: insights from a new voltammetric approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 405:5201–5214. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-6947-5>.
  10. Goodwin LG, Page JE. 1943. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.* 37:198–209.
  11. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. 2009. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* 14:2317–2336. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14072317>.
  12. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 279:39925–39932. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M405635200>.
  13. Wyllie S, Fairlamb AH. 2006. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem. Pharmacol.* 71:257–267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.043>.
  14. Timerstein MA, Plews PI, Walker CV, Woolery MD, Wey HE, Torason MA. 1995. Antimony induces oxidative-stress and toxicity in cultured cardiac myocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130:41–47. <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1995.1006>.
  15. Pulido MD, Parrish AR. 2003. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat. Res.* 533:227–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.015>.
  16. Silva Junior JB. 2001. Relatório técnico antimoniatado de meglumina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34:103–105. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-8562001000100001>.
  17. Demicheli C, Ochoa R, Lula IS, Gozzo FC, Eberlin MN, Frézard F. 2003. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimoniate. *Appl. Organomet. Chem.* 17:226–231. <http://dx.doi.org/10.1002/aoc.425>.
  18. Dzamitika SA, Falcão CAB, Oliveira FB, Marbeuf C, Garnier-Suillerot A, Demicheli C, Rossi-Bergmann B, Frézard F. 2006. Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. *Chem. Biol. Interact.* 160:217–224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2006.01.008>.
  19. González MJ, Miranda-Massari JR, Mora EM, Guzmán A, Riordan NH, Riordan HD, Casciari JJ, Jackson JA, Román-Franco A. 2005. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integ. Cancer Ther.* 4:32–44. <http://dx.doi.org/10.1177/1534735404273861>.
  20. Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M. 2005. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:13604–13609. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506390102>.
  21. Fromberg A, Gutsch D, Schulze D, Vollbracht C, Weiss G, Czubyko F, Aigner A. 2011. Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells toward cytostatic drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67:1157–1166. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-010-1418-6>.
  22. Bahlis NJ, McCafferty-Grad J, Jordan-McMurry I, Neil J, Reis I, Kharfan-Dabaja M, Eckman J, Goodman M, Fernandez HF, Boise LH, Lee KP. 2002. Feasibility and correlates of arsenic trioxide combined with ascorbic acid-mediated depletion of intracellular glutathione for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 8:3658–3668. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR.010001>.
  23. Qazilbash MH, Saliba RM, Nieto Y, Parikh G, Pelosini M, Khan FB, Jones RB, Hosing C, Mendoza F, Weber DM, Wang M, Popat U, Alousi A, Anderlini P, Champlin RE, Giralt S. 2008. Arsenic trioxide with ascorbic acid and high-dose melphalan: results of a phase II randomized trial. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14:1401–1407. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.09.019>.
  24. Singh S, Rana SVS. 2007. Amelioration of arsenic toxicity by L-ascorbic acid in laboratory rats. *J. Environ. Biol.* 28:377–384. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-007-0001-0>.
  25. Singh S, Rana SVS. 2007. Protective effect of ascorbic acid against oxidative stress induced by inorganic arsenic in liver and kidney of rat. *Indian J. Exp. Biol.* 45:371–375. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-007-0001-0>.
  26. Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee J-H, Krishna MC, Shacter E, Choyke PL, Pooput C, Kirk KL, Buettner GR, Levine M. 2007. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:8749–8754. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702854104>.
  27. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* 7:545–555. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.1985.tb00098.x>.
  28. Schettini DA, Ribeiro RR, Demicheli C, Rocha OGF, Melo MN, Michalick MSM, Frézard F. 2006. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int. J. Pharm.* 315:140–147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.048>.
  29. Luna LG. 1968. Production, p 38–39. In Luna LG (ed), *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, Blackiston Division, 3rd ed. McGraw-Hill Book Co, New York, NY.
  30. Trott JR. 1961. An evaluation of methods commonly used for the fixation and staining of glycogen. *J. Histochem. Cytochem.* 9:703–710. <http://dx.doi.org/10.1177/9.6.703>.
  31. Angermuller S, Fahimi HD. 1983. Selective staining of cell organelles in rat liver with 3,3'-diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.* 31:230–232. [http://dx.doi.org/10.1177/31.1A\\_Suppl.6186726](http://dx.doi.org/10.1177/31.1A_Suppl.6186726).
  32. Seedorf U, Raabe M, Ellinghaus P, Kannenberg F, Fobker M, Engel T, Denis S, Wouters F, Wirtz KWA, Wanders RJA, Maeda N, Assmann G. 1998. Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. *Genes Dev.* 12:1189–1201. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.12.8.1189>.
  33. Beier K. 1992. Light microscopic morphometric analysis of peroxisomes by automatic image analysis: advantages of immunostaining over the alkaline DAB method. *J. Histochem. Cytochem.* 40:115–121. <http://dx.doi.org/10.1177/40.1.1370307>.
  34. Soini Y, Paakko P, Lehto VP. 1998. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am. J. Pathol.* 153:1041–1053.
  35. Ribeiro MC, Coutinho LMB, Hilbi A. 2004. The role of apoptosis, cell proliferation index, bcl-2, and p53 in glioblastoma prognosis. *Arq. Neuropsiquiatr.* 62:262–270. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2004000200014>.
  36. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493–501. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.119.3.493>.
  37. Sudhandiran G, Shaha C. 2003. Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Biol. Chem.* 278:25120–25132. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M301975200>.
  38. Basu JM, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Sen P, Banerjee S, Naskar K, Choudhuri SK, Saha B, Raha S, Roy S. 2006. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1788–1797. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.50.5.1788-1797.2006>.
  39. Grimaldi GJR, Porozzi R, Friedrich K, Teva A, Marchevsky RS, Viera F, Miekeley N, Paumgarten FJR. 2010. Comparative efficacies of two antimony regimens to treat *Leishmania braziliensis* induced cutaneous leishmaniasis in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:502–505. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00858-09>.
  40. Carter KC, Baillie AJ, Alexander J, Dolan TF. 1988. The therapeutic effect of sodium stibogluconate in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* is organ dependent. *J. Pharm. Pharmacol.* 40:370–373. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2002.03863.x>.
  41. Lynch BS, Capen CC, Nestmann ER, Veenstra G, Dey JA. 1999. Review of subchronic/chronic toxicity of antimony potassium tartrate. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30:9–17. <http://dx.doi.org/10.1006/rtph.1999.1312>.
  42. Lecreux V, Le Thiec A, Le Meur A, Amiot L, Drenou B, Bernard M, Lamy T, Fauchet R, Fardel O. 2002. Potassium antimonyl tartrate induces caspase- and reactive oxygen species-dependent apoptosis in lymphoid tumoral cells. *Br. J. Haematol.* 119:608–615. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03863.x>.

AQ: L

Kato et al.

43. Lösler S, Schlieff S, Kneifel C, Thiel E, Schrezenmeier H, Rojewski MT. 2009. Antimony trioxide- and arsenic-trioxide-induced apoptosis in myelogenous and lymphatic cell lines, recruitment of caspases, and loss of mitochondrial membrane potential are enhanced by modulators of the cellular glutathione redox system. *Ann. Hematol.* **88**:1047–1058. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-009-0736-4>.
44. Goyeneche-Patino DA, Valderrama L, Walker J, Saravia NG. 2008. Antimony resistance and trypanothione in experimentally selected and clinical strains of *Leishmania panamensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4503–4506. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01075-08>.
45. Bijur GN, Ariza ME, Hitchcock CL, Williams MV. 1997. Antimutagenic and promutagenic activity of ascorbic acid during oxidative stress. *Environ. Mol. Mutagen.* **30**:339–345. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1997\)30:3<339::AID-EM13>3.0.CO;2-E](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1997)30:3<339::AID-EM13>3.0.CO;2-E).