

239425

LEISHMANIOSES – A BUSCA DE UMA TERAPÊUTICA MAIS ESPECÍFICA E MENOS TÓXICA

Geny Aparecida Cantos

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo pesquisar uma medicação mais específica e menos tóxica para doenças ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania*, a partir da levedura de panificação e sua posterior complexação com antimônio. A droga preparada foi comparada com a existente no mercado (o Glucantime) mostrando superioridade leishmanicida tanto "in vitro" como "in vivo".

Geny Aparecida Cantos – Farmacêutica - Bioquímica, Mestre em Físico-Química, Doutora em Bioquímica, Professora de Bioquímica do CEFET-PR –UNED/Medianeira.
Este trabalho representa uma parte de sua tese de doutorado, orientada pelo Dr. Prof. Albert J.P. Gorin da UFPR - Departamento de Bioquímica.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças não contagiosas, transmitidas por insetos do gênero *Phebotomus* ou *Lutzomya*, conhecidos mais pelos nomes de mosquito palha, birigui. Estes mosquitos, estando contaminados, ao picarem o homem ou outro animal, regurgitam as leishmanias que penetram passivamente pela picada, atingindo o sistema monocítico fagocitário, reproduzindo-se intensamente e levando às mais diversas lesões. Podemos resumir todas essas variedades de lesões, agrupando as leishmanioses em 3 grupos:

1. Formas em que os protozoários ocasionam lesões apenas cutâneas, com nódulos fechados, podendo encontrar grande número de parasitas nessas lesões. Essa forma é encontrada predominantemente no sul da Rússia, na Arábia, Grécia e outros países do Mediterrâneo. No Brasil a maior parte dos casos de leishmanioses cutâneas é atribuída à *leishmania (leishmania) amazonensis*, encontrando-se principalmente na região Norte.
2. Formas cutâneas ulcerosas, com número de parasitas escassos, que podem complicar-se comprometendo as mucosas do nariz, da boca e da faringe, dificultando, nesse caso, a respiração, impedindo a alimentação, podendo levar o indivíduo à morte por caquexia ou mesmo por invasão bacteriana. Essas doenças são conhecidas popularmente pelos nomes de espúndia, úlcera de Bauru, úlcera dos Pescadores. No Paraná, em especial, tem-se relatado um índice de 500% para essas formas.
3. Formas viscerais, onde os parasitas apresentam acentuado tropismo pelo sistema monocítico fagocitário visceral, principalmente do baço, do fígado e da medula óssea. É conhecida entre outros, pelos nomes de calazar (que significa febre negra), febre de Dum-Dum e esplenomegalia tropical. O calazar é uma doença que leva a uma desnutrição e enfraquecimento muito grandes, acarretando inativação para o trabalho, além do alto índice de mortalidade.

Embora o homem não represente um reservatório epidemiologicamente importante nas Américas (diferindo do calazar da Índia), a preocupação com a terapêutica específica das leishmanioses se justifica, por razões óbvias e, até certo ponto, prende-se a adequá-la à nossa realidade.

Ao contrário do que se passa em certos países do Oriente, onde o tratamento da leishmaniose pode ser exclusivamente local, entre nós deve ser feita de maneira mais específica e enérgica. Assim muitas drogas têm sido ensaiadas e utilizadas na terapêutica das leishmanioses. Entre elas destacam-se os antimoniais orgânicos, as diaminas aromáticas e a Anfotericina B.

Antes do advento dos antimoniais (1912), os métodos utilizados para o tratamento das leishmanioses consistiam em raspagens e cauterizações com nitrato de prata, ácido, fogo, etc. (Vianna 1914). Em relação aos antimoniais a literatura é ampla no sentido da sua ação

parasiticida, entretanto, inúmeros são os efeitos tóxicos relatados. No Brasil, hoje, o único produto encontrado no comércio é o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime). A substância é encontrada em ampolas de 5.0ml em solução de 30%. As séries de tratamento consistem de 8 a 30 injeções, começando com 0,5 cm diários.

2. OBJETIVOS DAS PESQUISAS ATUAIS

O estágio atual de conhecimentos em relação à terapêutica específica, reflete o embate de conceitos insuficientemente claros. Dentro deste contexto, ressalta-se a necessidade de uma terapêutica mais específica e menos tóxica que propicie ao leishmaniótico resultados mais seguros de cura.

Na presente investigação além da droga preparada, a atividade leishmanicida foi testada em nível celular "in vitro" e "in vivo" em animais de laboratórios com a colaboração da Professora Clara Lúcia Barbieri Mestriner e do Professor L.R. Travassos da Escola Paulista de Medicina.

O embasamento da pesquisa atual levou em conta que espécies do gênero *leishmania*, vivem exclusivamente dentro do macrófago no hospedeiro vertebrado (Abok et alii, 1988) e que algumas classes de macrófagos apresentam receptores manosil (Stahl e Gordon, 1982 e Person, 1987). Assim, parece que a manana de levedura, que contém unidades α - D-manopiranosil, pode ser particularmente complexada com antimônio e, assim, ser reorganizada e endocitada pelos macrófagos. Dessa forma, as drogas antimoniais à base de manana seriam reconhecidas e endocitadas pelo macrófago, provocando a liberação de pentóxido de antimônio no ambiente ácido do fagolisossoma, sendo este composto altamente tóxico para o protozoário.

Com este objetivo foi preparada manana (extraída da levedura de panificação) a qual foi complexada com antimônio. Este complexo foi utilizado nos testes biológicos realizados "in vitro" em macrófagos e "in vivo". O protozoário utilizado foi *leishmania (leishmania) amazonensis*. Numa etapa final, a atividade leishmanicida foi comparada com a droga comercial e o efeito receptor manosídeo, foi analisado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Preparação da Manana de Levedura de Panificação

A maioria das leveduras contém, em suas paredes, mananas ou heteropolissacarídeos contendo manose, glucose e outras aldoses (Gorin & Spencer, 1970). A fim de extrair esses polissacarídeos, a levedura de panificação foi aquecida em solução aquosa alcalina e o produto foi fracionado utilizando-se solução de Felhing (Jones & Stoodley, 1965). O complexo cúprico insolúvel de manana foi decomposto através da

resina Amberlite IR-120 (forma H⁺), liberando manana com um rendimento de 2,2%.

A figura 1 mostra a estrutura química da manana (Lee & Ballou, 1965), a qual apresenta uma cadeia principal de α - D-manopiranosose com ligações (1-> 6), que é substituída na posição 2, com cadeias laterais de manopiranosose contendo ligações α (1-> 2) e α (1-> 3).

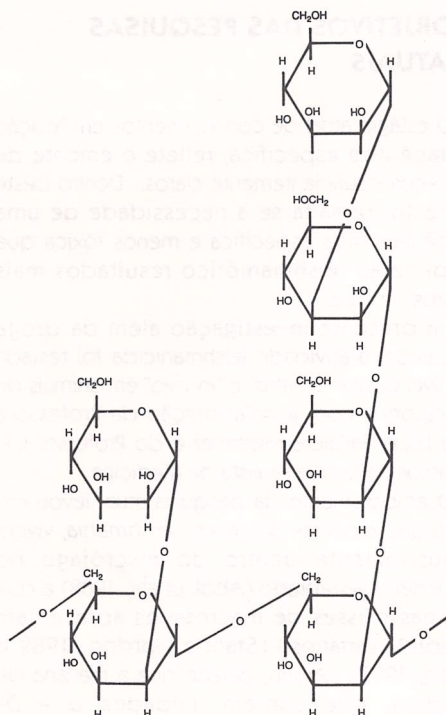
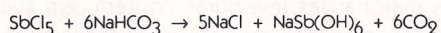


Fig. 1 - Estrutura química da manana (Lee & Ballou, 1965)

3.2. Reação da Manana e seus Derivados com Antimônio

Os complexos de antimônio com carboidratos podem ser formados pela ação coloidal com pentóxido de antimônio. O pentacloreto de antimônio foi adicionado, assim, a uma solução de polissacarídeo em água, de forma que a concentração de ácido clorídrico produzido não suficientemente capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas. Após 5 minutos, a reação foi neutralizada com bicarbonato aquoso. Posteriormente, a reação foi aquecida a 60°C por uma hora a fim de liberar todo dióxido de carbono formado durante a reação, bem como delimitar o término da reação com pentóxido de antimônio com manana. Todos os produtos formados insolúveis em água foram eliminados após o processo de centrifugação.



O cloreto de sódio também foi eliminado quando o complexo polissacarídeo antimoniato foi precipitado em metanol ou quando a solução foi dialisada e o produto preparado foi liofilizado.

A análise do conteúdo de antimônio foi realizada conforme técnica apresentada por,

Vogel, 1981. Pode-se observar que o conteúdo de antimônio de amostra dialisada é menor que aquele, quando precipitado em metanol, e que o conteúdo de antimônio é proporcional à quantidade de pentacloreto de antimônio adicionado à reação. Assim, quando se utilizou 2.3 moles/mol de pentacloreto de antimônio e o polissacarídeo foi precipitado em metanol, obteve-se um percentual de Sb de 9.7. Quando se utilizou 1.56 moles de pentacloreto de antimônio decaiu para 6.4 e quando se utilizou 0.78 caiu ainda mais para 0.78. (tab. 1)

3.3. Testes de Atividade Biológica

Os macrófagos são células capazes de ingerir partículas e substâncias solúveis. As espécies do gênero *Leishmania* têm sido como habitat do próprio sistema monocítico fagocitário. Assim, os testes biológicos foram realizados a partir de culturas de macrófagos infectados por formas amastigotas (forma existente no hospedeiro vertebrado) da espécie *L. (L.) amazonensis*, o qual foi obtido da lesão da pata de hamster ou camundongo Balb/c.

A droga escolhida para os testes biológicos foi aquela cujo conteúdo de antimônio foi em torno de 3.1%, pois quanto maior é a complexação maior é a insolubilidade. Mesmo trabalhando com esse nível de complexação o complexo manana-Sb mostrou-se parcialmente insolúvel (com rendimento de aproximadamente 50%) de forma que o conteúdo real de antimônio foi de 0.88%. Este foi o percentual de Sb real da droga testada. As concentrações utilizadas nos testes biológicos preliminares foram de 1.0, 2.0 e 3.0mg/ml.

TABELA I
Determinação do conteúdo de antimônio no complexo Manana-Sb pelo método espectrofotométrico (Vogel, 1981).

Material complexado	A(2.3)		B(1.56)		C(0.78)	
	M	D	M	D	M	D
Manana	9.7	3.6	6.4	2.5	3.1	1.5

A, B e C - referem-se ao percentual de antimônio quando se utilizou na reação 2.3, 1.56 e 0.78 moles/mol de pentacloreto de antimônio respectivamente.

M e D - referem-se à complexação de polissacarídeos com antimônio, quando estes foram precipitados em metanol e dialisados, respectivamente.

NOTA: Conteúdo de antimônio foi determinado também para o Glucantime e foi igual a 21.8%.

TABELA II
Resposta "in vitro" de macrófagos peritoneais de camundongos albinos com *L. (L.) amazonensis* tratados com manana-Sb.

Polissacarídeo	Concentração do polissacarídeo					
	1mg/ml			2mg/ml		
	I	AM	IF	I	AM	IF
Manana	95	3	285	94	3	282
Manana-Sb	54	1.7	91.3	16	0.16	2.56

I - Porcentagem de macrófagos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*.

AM - Número médio de protozoários por macrófagos

IF - Índice fagocitário (I x AM)

Os resultados deste experimento estão na tabela II, onde se pode observar que a percentagem de destruição dos parasitas para culturas tratadas com 1mg/ml de Man-Sb foi de 68% e 99% quando se utilizou 2mg/ml de Man-Sb comparadas ao controle (macrófagos tratados com Man-Sb). Com estes resultados podemos concluir que, embora os macrófagos tenham receptores para os monossídeos, o antimônio é um elemento necessário para destruição dos parasitas.

A atividade leishmanicida do complexo Manana-Sb foi examinada utilizando-se macrófagos peritoneais de camundongos albinos infectados com forma amastigotas de *L. (L.) amazonensis* nos macrófagos tratados com diferentes concentrações de manana-Sb. Pode-se observar que a manana por si só não é ativa. Por outro lado, quando se utiliza o complexo manana-Sb nas concentrações de 4,4 e 6,6µg/ml de Sb, em apenas 3 dias há acentuada destruição das formas amastigotas. Pode-se observar ainda pela figura 2 que após 5 dias de tratamento houve uma destruição de 3 vezes mais parasitas quando se utiliza Man-Sb em relação ao Glucantime na mesma concentração de Sb. Por outro lado, a manana não apresentou qualquer efeito sobre as formas amastigotas nos macrófagos.

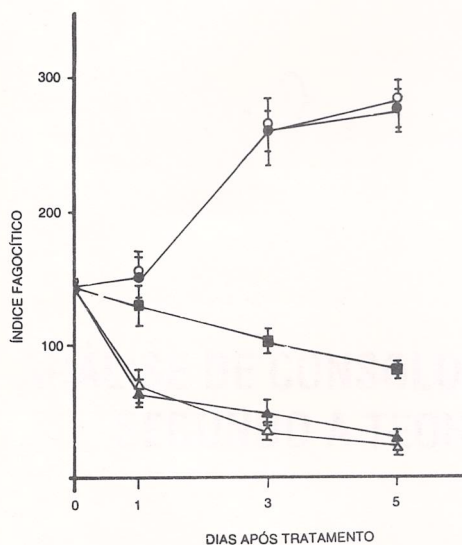


Fig. 2 - Tratamento de macrófagos peritoneais com diferentes concentrações do Man-Sb.
 Δ - PBS - ○ - manana 750µg/ml; - Δ - Man-Sb 500µg/ml (4,4µg/ml Sb); Δ - Man-Sb 750µg/ml (6,6µg/ml Sb); - B - Glucantime (6,6µg/ml Sb)

Com o objetivo de se verificar se a penetração da manana-Sb nos macrófagos ocorre via receptor de manose, foi feito um ensaio de competição com manana e manose. A figura 3 mostra que concentrações crescentes de manana administrada concomitantemente à Manana-Sb inibem, proporcionalmente, a destruição mediada pelo complexo. Resultados semelhantes foram obtidos quando se utilizaram concentrações crescentes de manose. Os dados mostram, assim, (figura 3) que há uma gradativa penetração da droga no macrófago,

provavelmente via receptor exclusivamente na superfície de macrófagos. Assim, pudemos observar que a ação do complexo Sb é dependente do receptor manosil, pois aumentando a concentração de manana há uma diminuição proporcional na destruição do parasita.

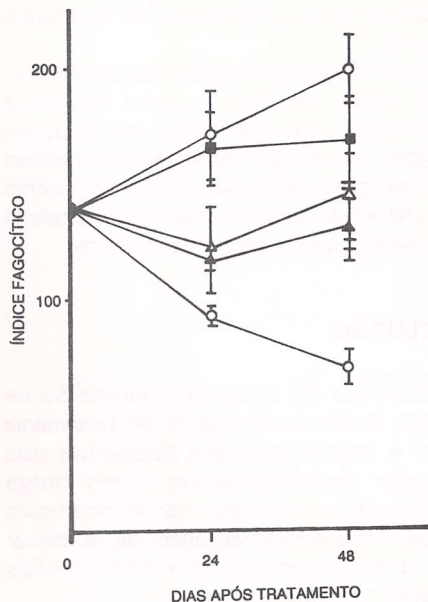


Fig. 3 - Inibição do efeito leishmanicida do Man-Sb pelo aumento da concentração da manana.
 ○ - controle de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*; ○ - tratamento com Man-Sb a 750µg/ml; Δ - Man-Sb e manana 250µg/ml; Δ - Man-Sb e manana 500µg/ml; Δ - Man-Sb e manana 1mg/ml.

O efeito do complexo manana-Sb sobre as lesões de pata de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* também pode ser observado; após 45 dias de infecção iniciou-se o tratamento com manana-Sb por via cutânea. Como pode ser visto na tabela III, até cerca de 22 dias após o tratamento houve uma significativa redução do tamanho das lesões nos animais tratados com glucantime. Os animais tratados com Man-Sb por via intraperitoneal não apresentaram redução das lesões em relação aos controles, assim como aqueles tratados com Glucantime (dados não mostrados).

TABELA III
 Tratamento das lesões da pata de Hamster com Man-Sb e Glucantime

Tratamento	Dias após tratamento			
	0	11	22	33
Controle (não tratado)	8,1	8,5	8,5	8,7
PBS	8,0	8,5	8,1	7,7
Manana 46mg	8,3	8,9	8,0	7,5
Man-Sb 390µg/Sb	6,4	4,3	4,2	5,1
Glucantime 65,4mg/Sb	7,3	4,2	3,7	4,2

Os valores representam o tamanho da lesão (diâmetro em mm) medidos como descrito e materiais e métodos, e equivalem à média de duas determinações. O diâmetro normal da pata é 3,5mm.

Nossos dados mostram claramente que, embora sejam necessários outros experimentos para otimizar a administração de manana-Sb em termos de dose e frequência, este complexo é comparável em eficiência ao Glucantime, pois utilizou-se uma concentração de 160 vezes mais de Glucantime em relação ao complexo manana-Sb, para se obter uma atividade biológica semelhante.

Maiores concentrações do complexo manana-Sb são ainda de uso limitado devido a insolubilidade dos complexos em soluções fisiológicas. A utilização de fragmentos menores de manana como carreadores de Sb, assim como outras alternativas de solubilização do complexo são necessárias para resolver este problema.

CONCLUSÃO

A eficiência do complexo Manana-Sb na destruição de formas amastigotas de *Leishmania* "in vitro" e "in vivo" abre uma perspectiva para introdução desse complexo como droga alternativa para o tratamento de leishmanioses humanas com a grande vantagem de se utilizar baixas doses de antimônio e obter menos toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOK, K.; FREDRIKSSON, B.A.; BRUNK, U. An experimental model system for leishmaniasis. An ultrastructural study on cultured macrophages exposed to *Leishmania* parasites and sodium stibogluconate. *APMIS*, v. 96. p. 589 - 95, 1988.
- GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. Proton magnetic resonance spectroscopy: an aid in identification and classification of yeast. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 13. , p. 15 - 89, 1970.
- JONES, J.K.N & STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes, *Methods Carbohydr. Chem.* v.5, p.36-38, 1965.
- LEE, Y.C. & BALLOU, C.E. Preparation of mannobiose, mannotriose, and a new mannotetraose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *Biochemistry* v.4 p. 257-264, 1965.
- PERSON, R. Antileishmanial activity of chlorpromazine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 25 p. 571-74, 1984.
- STAHL & GORDON, S. Expression of a mannoyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. *J. Cell. Biol.*, v. 93 p. 49-56, 1982.
- VIANNA, G. Sobre o tratamento da leishmaniose tegumentar. *Ann. Paul. Med Cirurgia*, v.6 p. 167-169, 1914.
- VOGEL, A. *Análise Inorgânica Quantitativa*. 4ª ed., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, S.A. 1981, 285.