

Avaliação das formulações contendo extrato metanólico de *Libidibia ferrea* contra infecção causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Jensen B.B.¹, Comandolli-Wyrepkowski C.D.^{1,3}, Santos P.A.², Barros A.M.C.¹, Soares F.V.^{1,3}, Pinheiro F.G.¹, Domingos P.R.C.^{1,3}, Naiff M.F.¹, Franco A.M.R.¹

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; ² Universidade Federal de Goiás;

³ Universidade Federal do Amazonas. Email: afranco@inpa.gov.br

Resumo

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença infecto-parasitária, mas não contagiosa de transmissão vetorial, cujo vetor é o Flebotomíneo fêmea que inocula no hospedeiro o parasita do gênero *Leishmania* que posteriormente desenvolverá diferentes formas clínicas de acordo com cada espécie do parasita. O tratamento terapêutico para esta doença apresentam diferentes problemáticas inerentes da eficácia à via de administração. O uso de produtos naturais torna-se uma grande alternativa para o tratamento desta doença, com intuito de extrair um princípio ativo que tenha ação antileishmania. Uma dessas plantas é a *Libidibia ferrea* que em trabalhos anteriores demonstrou atividade leishmanicida contra diferentes espécies de *Leishmania in vitro*. Portanto, surge à necessidade da avaliação biológica de sua atividade perante um ensaio *in vivo*.

Palavras-chaves: *Leishmania amazonensis*, *Mesocricetus auratus*, tratamento tópico, *Libidibia ferrea*, atividade antileishmania

Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, podendo apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Gontijo *et al.*, 2003). A Leishmaniose Tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 98 países,

distribuídos nos cinco continentes (África, América, Ásia, Europa e Oceania), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos (Alvar, 2012; Brasil, 2010).

Os fármacos utilizados como terapêutica para o tratamento da LT apresenta uma série de problemas, incluindo resistência do parasito, indução de efeitos colaterais e abandono dos pacientes por serem medicamentos de administração parenteral (Silva-López, 2010). A necessidade de tratamentos com maior eficácia e segurança vem estimulando pesquisas com produtos naturais de plantas com atividade antileishmania, levando em consideração que os vegetais possuem uma diversidade química de metabólitos secundários estruturalmente únicos.

Trabalhos anteriores mostraram inibição do crescimento *in vitro* de *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (Cortez, 2004; Falcão, 2010). Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar em modelo *in vivo*, utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*), a atividade de formulações tópicas contendo o extrato metanólico de *Libidibia ferrea*, uma planta nativa da região Amazônica, no tratamento da forma cutânea da Leishmaniose, a partir dos aspectos da evolução clínica e o volume da lesão resultante da infecção desses animais experimentais com *Leishmania amazonensis* após o tratamento tópico.

Material e Métodos

Animais experimentais - O modelo biológico para o estudo foram 30 hamsters (*Mesocricetus auratus*) adultos (acima de 90 dias), machos. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, e o procedimento para o tratamento dos animais infectados ocorreu nas dependências do próprio Biotério. O projeto foi aprovado por Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/INPA, sob o número 009/2012.

Procedimentos para o tratamento tópico - Foram inoculados 10^6 cel/mL do parasito *L. amazonensis* (MHO/BR/2006/IM5584) no focinho de cada animal para o desenvolvimento da lesão cutânea. Após a inoculação, os animais foram separados e agrupados em gaiolas identificadas. Os grupos foram separados para receber os tratamentos: formulação com extrato MeOH de *L. ferrea* (EMX 1), formulação placebo (EMX 2), formulação com extrato de *L. ferrea* e Glucantime® (EMX 3), tratamento

com aplicações parenterais com Glucantime® (controle positivo) e grupo sem tratamento (controle negativo). As formulações foram aplicadas uma vez ao dia, 50 mg/aplicação/animal, na área e proximidades da lesão. A área total das lesões foi aferida diariamente com um paquímetro e o aspecto morfológico foi fotodocumentado.

Após a eutanásia dos animais com Euthanyle®, as lesões foram seccionadas no eixo longitudinal e desinfetadas. Foram transferidos segmentos de tecido para tubos com meio de cultura NNN (Nicolle, 1908; Novy, McNeal, 1904) e segmento para impressão em lâmina. Os tubos de cultura com meio NNN foram incubados em estufa a 25°C durante 7 dias para observação da presença/ausência de parasitas viáveis. As lâminas foram coradas pelo método de Giemsa, e quantificadas em microscopia óptica (1000X) quanto aos valores médios de amastigotas extracelulares e interiorizados em macrófagos.

Estatística - As médias dos volumes das lesões foram analisados por ANOVA e teste Tukey, a partir do programa GraphPadPrism versão 6. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

Formulações - As formulações foram preparadas segundo metodologia confidencial, acordo Internacional entre o INPA e a Universidade de Helsinki, pelo programa VAIKUTUS – FP7 – PEOPLE – IRSES – 295262.

Resultados e Discussão

Após 30 dias da inoculação dos animais de experimentação, os hamsters apresentaram lesão característica de leishmaniose na forma cutânea na região do focinho, mostrando um aumento no volume da região.

Habitualmente são utilizados camundongos ou hamsters jovens e pré-púberes em ensaios biológicos *in vivo* para a Leishmaniose, pois estes são mais suscetíveis a infecção (Lima, 2008). Quanto a inoculação, esta pode ser realizada em diferentes partes do corpo como, na base da cauda por via intradérmica (Rodrigues, 2012), no coxim plantar (Eissa *et al.*, 2011) ou até mesmo no focinho, local definido para os experimentos do presente projeto.

Segundo Suman e Nichi (2011), através dos modelos animais é possível analisar a atividade de drogas em relação à absorção, distribuição, metabolismo e excreção e para dar uma indicação inicial da toxicidade, embora nenhum reproduza com precisão o que acontece nos humanos.

Após os vinte e cinco dias de tratamento foi possível avaliar o aspecto (macroscópico) clínico das lesões dos hamsters de todos os grupos, e determinar uma comparação entre eles. Todos os animais apresentaram lesão de forma nodular bem desenvolvida, diferentemente das lesões de animais que são infectados com o parasita *Leishmania braziliensis*, com lesões de aspecto nodulares pequenos e pouco aparentes, compatíveis para início do tratamento (Lainson, 2010).

O grupo EMX 1 durante e após o tratamento desenvolveram uma crosta na área da lesão e não foi observada uma redução da lesão como se esperava. Os animais do grupo EMX 2 durante e após o tratamento desenvolveram na lesão uma úlcera de tamanho relativamente pequeno. Os animais dos grupos EMX 3 e Controle positivo durante e após o tratamento apresentaram lesões nodulares, mas não obteve-se uma redução considerável das lesões nos animais, já que o medicamento utilizado no grupo controle é o mesmo preconizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento para Leishmaniose (Brasil, 2010). Acredita-se que por conta da suscetibilidade dos animais de experimentação a desenvolver a doença, a concentração do Glucantime® utilizada foi insuficiente, já que outros trabalhos demonstraram a necessidade de pelo menos 100 mg para a cura dos animais de experimentação (Lima, 2008; Rodrigues, 2012). Os animais do grupo controle negativo durante e após o tratamento, as lesões se agravaram e apresentaram características ulcerosas e com infecções secundárias (Figura 1).

Os fragmentos das lesões provenientes dos animais dos grupos que foram semeados em meio NNN para verificação de parasitos viáveis com grau de infectividade, todos os tubos apresentaram parasitas na forma promastigotas, com morfologias fusiformes e viáveis, no entanto somente nos grupos EMX 2, CON+ e CON- foram observadas rosetas nos cultivos após sete de dias de incubação.

Evolução da lesão durante o Tratamento

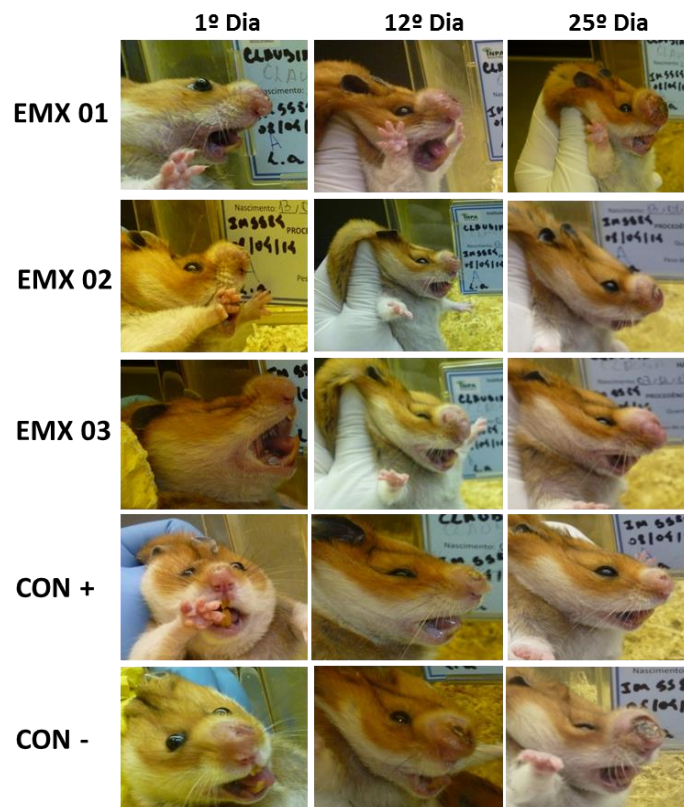


Figura 1 - Evolução clínica (observação macroscópica) das lesões em focinho de *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em diferentes fases do estudo de tratamento tópico. EMX1, EMX2 e EMX3 formulações utilizadas em sigilo científico; CON+ = tratamento com Glucantime®; CON- = grupo com ausência de tratamento.

A aferição diária dos volumes dos focinhos, registradas no decorrer do tratamento dos animais permitiu calcular as médias dos volumes das lesões e consequente avaliação da significância estatística. Pode-se observar que a partir do 13º dia o grupo CON+ demonstrou significância estatística. O grupo EMX 3 apresentou significância estatística a partir do 17º dia. O grupo EMX 2 apresentou significância estatística a partir do 19º dia. O grupo EMX 1 apresentou significância estatística a partir do 20º dia, segundo o teste Anova e Tukey com parâmetro de $p < 0,05$ referente ao grupo CON- (Figura 2).

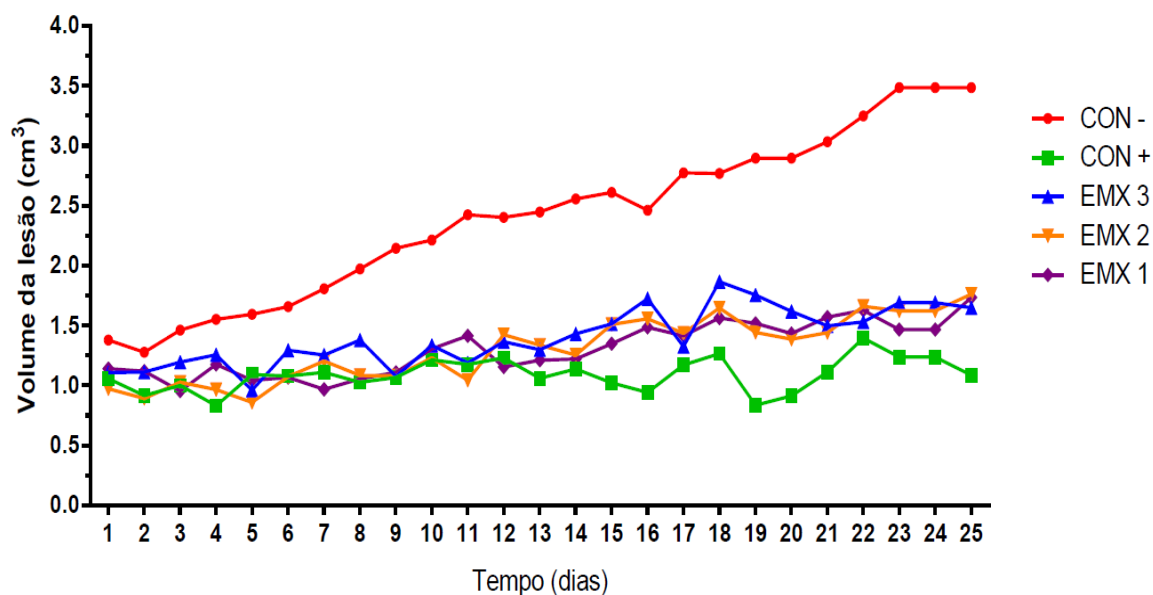


Figura 2 - Evolução clínica do volume da lesão em *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* durante o tratamento com as formulações tópicas e Glucantime®.

Conclusões

Após a análise dos resultados obtidos na avaliação das formulações, pode-se concluir que houve diferença no aspecto clínico entre os grupos tratados com formulações tópicas em relação ao controle, onde o grupo EMX1 apresentou um desempenho semelhante ao grupo com Glucantime, no entanto, a análise parasitológica demonstrou a presença de parasitas viáveis em todos os animais. Estes fatores demonstraram a necessidade da continuidade dos estudos com ajustes de concentrações nas formulações tópicas contendo princípios ativos do estrato de *L. ferrea* e um maior tempo de experimentação, além da inclusão de outros parâmetros farmacológicos a serem estudados.

Referências

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, DenBoer M (2012) WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis World wide and global estimates of its incidence. *PLoSOne*, 7: 35671.

Brasil (2010) Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde.

Cortez AC (2004) Avaliação da atividade in vitro dos extratos fitoquímicos de *Libidibia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales – Libidibiaceae) para *Leishmania* spp. e *Trichophyton* spp. Manaus, Brasil, 86p. (Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical, Universidade Federal do Amazonas. UFAM).

Eissa MM, AMER EI, EL SAWY SMF (2011) *Leishmania major*: Activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 128: 382-390.

Falcão NMS (2010) Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e análise de frações semi-purificadas de *Libidibia ferrea* Martius (Fabales: Libidibiaceae). Manaus, Brasil, 83p. (Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Amazonas. UFAM).

Gontijo B, Carvalho MLR (2003) Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 71-80.

Lainson R (2010) The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their Discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amaz Saude*, 1(2): 13-32.

Lima LFA (2008) A Influência do Gênero e da Infecção materna na resposta à *Leishmania braziliensis* em filhotes de hamster. Fortaleza, Brasil, 52p. (Dissertação de Mestrado em Patologia, Universidade Federal do Ceará. UFC).

Nicolle GL (1908) Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C.R. Acad. Sci.* 146: 842-843.

Novy FG, MacNeal WJ, (1904) On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J. Infect. Dis.* 1: 1-30.

Rodrigues LF (2012) Avaliação da atividade in vivo do antimoníato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*

isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. Minas Gerais, Brasil, 91p. (Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz).

Silva-López RE (2010) Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova* 33: 1541-1543.

Suman G, Nishi (2011) Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug Discovery. *Indian J Med. Res.* 133: 27-39.