

AValiação DE UM SISTEMA DE DELIVERY PARA ANFOTERICINA B COM VISTAS À REDUÇÃO DE SUA TOXICIDADE, SEM PERDA DE ATIVIDADE FUNCIONAL, CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL

Raquel Soares Bandeira (Graduanda)¹, Débora V. C. Mendonça (Doutoranda)², Grasielle S.V. Tavares (Doutora)², Daniela P. Lage (Doutoranda)², Vivian T. Martins (Doutora)², Fernanda F. Ramos (Doutoranda)², Thaís T.O. Santos (Doutoranda)², Lourena E. Costa (Doutora)², Fernanda Ludolf (Doutora)², João A. Oliveira-da-Silva (Doutorando)², Daniel S. Dias (Doutor)², Patrícia A. F. Ribeiro (Doutoranda)², José Mário Barichello (Doutor)³, Eduardo A. F. Coelho (Doutor. Orientador)^{1,2}

¹ Setor de Patologia Clínica, Coltec, Universidade Federal de Minas Gerais.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

Resumo

O tratamento das leishmanioses é baseado no uso de antimonialis pentavalentes, que são tóxicos aos pacientes. A anfotericina B (AmpB) é um fármaco de segunda escolha efetivo contra os parasitos, no entanto, causa toxicidade renal, hepática e cardíaca nos pacientes. Dessa forma, este projeto teve como objetivo desenvolver uma formulação composta por micelas poliméricas (Pluronic P127) incorporando a AmpB, de modo a reduzir sua toxicidade sem perda funcional. Como objetivos específicos, o projeto avaliou o uso das micelas contendo AmpB no tratamento da leishmaniose visceral (LV) causada por *Leishmania infantum* em camundongos BALB/c, por meio da resposta celular e humoral e avaliação da carga parasitária após o tratamento.

Autorização legal: O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG, tendo o número de protocolo 085/2017.

Palavras-chave: Tratamento, Leishmanioses, Toxicidade.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES e UFMG.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFMG.

Introdução

As leishmanioses ocorrem em 98 países no mundo, com 1.0 a 1.5 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) e cerca de 500 mil novos casos de leishmaniose visceral (LV) sendo registrados (Alvar et al., 2012; WHO, 2019; Mishra et al., 2011). Embora apresente elevada incidência, as leishmanioses são doenças negligenciadas, sendo que poucos avanços foram obtidos em relação à melhoria do tratamento da doença. Os antimonialis pentavalentes foram introduzidos como quimioterápicos na década de 40 e, até hoje são os principais fármacos utilizadas no tratamento da doença (Goto & Lindoso, 2010). Entretanto, os mesmos causam graves efeitos adversos, como toxicidade renal, hepática e cardíaca (Murray et al., 2005). A anfotericina B (AmpB) é considerada um fármaco de segunda linha, que é ativa contra *Leishmania*, porém, o fármaco interage também com a membrana celular de células do hospedeiro, causando efeitos tóxicos aos pacientes. Com vistas à melhoria de seu índice terapêutico e para reduzir a toxicidade do mesmo, formulações lipossomais contendo AmpB foram desenvolvidas, tais como AmpBisome®, AmphocilH® e Abelcet®, porém, as mesmas têm custo elevado. Desse modo, o projeto teve como foco desenvolver uma formulação composta por micelas poliméricas capazes de incorporar a AmpB, de modo a permitir uma liberação lenta do fármaco, com menor dose e causar menos efeitos tóxicos aos pacientes. Pretende-se desenvolver um novo produto que futuramente seja capaz de ser avaliado em humanos para a melhoria do tratamento da leishmaniose visceral.

Metodologia

In vivo: Utilizou-se camundongos BALB/c fêmeas. **Parasitos e antígenos:** *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) foi cultivada a 24°C em meio de Schneider com 20% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina 20mM, penicilina 200U/mL, estreptomicina 100ug/mL pH7,4. O extrato solúvel de *Leishmania* (SLA) foi preparado a partir de 1010 promastigotas estacionárias. **Micelas:** Pluronic P127 foi adicionado a um tampão salino de fosfato pH7,4 sob agitação magnética moderada e em banho de gelo. Em seguida, AmpB

(1mg/mL) foi adicionado a um microtubo contendo 500µL de diclorometano e solubilizado usando vórtice. A solução foi imediatamente adicionada ao Pluronic P127 sob agitação magnética vigorosa e em banho de gelo, até que uma emulsão viscosa fosse obtida. As micelas vazias foram preparadas usando o mesmo protocolo técnico descrito, mas sem adicionar AmpB. **Infecção e tratamento:** Os camundongos foram infectados por via subcutânea com 10^7 promastigotas estacionárias e, 30 dias após, foram divididos em grupos com oito animais cada, tratados por 10 dias por injeção diária como descrito: a) Grupo Controle (saline); b) Grupo Micela (B-Amp/M 1mg/kg); c) Grupo micela com AmpB (Amp/M 1mg/kg de AmpB; d) Grupo Glucantime (Gluc 1mg/kg; e,f) Grupo AmpB livre (Free Amp) e lipossomal (Lip-Amp 1 mg/kg de AmpB). **Carga parasitária:** A avaliação foi realizada 1 e 15 dias após o tratamento por diluição limitante do baço, fígado, linfonodo drenante (dLN) e medula óssea. **Resposta imune:** Culturas de esplenócitos foram realizadas após a eutanásia, 1 e 15 dias após o término do tratamento. As células (5×10^6) foram cultivadas em placas de 24 poços em meio DMEM e não estimuladas (controle) ou estimuladas com SLA (50 µg/ml) a 37°C em 5% de CO₂ por 48 h. As citocinas IFN-γ, IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram quantificadas por ELISA de captura nos sobrenadantes, utilizando-se kits comerciais. Os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para parasitas foram medidos em amostras de soro coletadas dos animais, 1 e 15 dias após o tratamento. Para isso, o SLA foi usado como antígeno (1,0 µg/well) e amostras de soro foram diluídas 1:100 em PBS-T (PBS 1x + Tween 20 0,05%), com incubação ocorrendo por 1h a 37°C. Após a lavagem, foram adicionados anticorpos anti-IgG1 ou IgG2a conjugados com peroxidase (diluição de 1:10.000 em PBS-T) e a reação foi desenvolvida por 1h a 37°C. Em seguida, uma solução contendo H₂O₂, OPD e tampão citrato-fosfato pH5,0 foi adicionada por 30min no escuro, e a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2M. A densidade óptica foi determinada por um espectrofotômetro a 492nm. **Estatística:** os resultados foram analisados pelo teste One-Way ANOVA e teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados e Discussão

A avaliação parasitológica foi realizada 1 e 15 dias após o tratamento. Observou-se reduções significativas na carga parasitária em todos os grupos tratados, quando comparado ao grupo salina, usado como controle de infecção, indicando um efeito antileishmanial indireto do próprio sistema polimérico. Camundongos tratados com Amp/M mostraram reduções mais significativas na carga parasitária quando comparados aos valores encontrados nos grupos Gluc, Amp livre e Lip-Amp. Da mesma forma, quando a carga parasitária foi avaliada 15 dias após os tratamentos, resultados similares foram encontrados. A resposta imune foi analisada, um e 15 dias após os tratamentos. Os resultados obtidos nos camundongos tratados com Amp/M mostraram uma resposta Th1 mais polarizada, com produção de IFN-γ, IL-12 e GM-CSF, associadas a baixos níveis de IL-4 e IL-10. Os tratamentos com AmpB, Lip-Amp e Gluc livres também induziram à produção dessas citocinas, porém, em níveis mais baixos em comparação com os dados encontrados no grupo Amp/M. Estudos demonstraram que a IL-10 atua como um papel importante na progressão da LV (Md & Ali, 2014), além de tornar os macrófagos não-responsivos aos sinais de ativação e inibir a morte de amastigotas, regulando negativamente a produção de IFN-γ e NO (Islamuddin et al., 2016). A redução efetiva da IL-10, associada à regulação positiva de IFN-γ e IL-12, atua como um fator chave para terapêuticas com sucesso (Bhattacharya et al., 2015, Bogdan, 2012). Mondal et al. (2010) mostraram que os pacientes com LV tratados com uma formulação Amp-lipídica apresentavam baixos níveis de IL-10 no plasma. Investigações sobre a produção de citocinas específicas do parasito por células mononucleares do sangue periférico também demonstraram uma resposta Th1 aumentada em pacientes curados, com regulação positiva de IFN-γ, IL-12 e TNF-α, associada a baixos níveis de IL-10. Esses resultados demonstram a importância dos efeitos imunomoduladores exercidos pelas diferentes citocinas na cura ou no desenvolvimento da doença ativa. Por fim, os níveis de anticorpos específicos para o parasita foram avaliados. Os camundongos tratados com Amp/M e Lip-Amp produziram níveis mais altos do isotipo IgG2a em ambos os períodos de tempo, embora o tratamento com Amp/M tenha induzido maior proporção entre IgG2a e IgG1, indicando um perfil imunológico Th1 mais polarizado nesses animais. Compreende-se que o curso da infecção por *L. infantum* é modulado pela resposta dos linfócitos T e rede de citocinas. O IFN-γ secretado pelas células Th1 promove a diferenciação de Th1 e inibe a proliferação das células Th2, com posterior ativação de linfócitos B e produção de IgG2a (Barbieri, 2006; Freita & Pinheiro, 2013). De outro modo, a IL-4 produzida pelas células Th2 promove a diferenciação das próprias células Th2 e, juntamente com IL-10, inibe a ativação das células Th1, aumentando a produção de IgG1 (Belkaid et al., 2002). Logo, a maior produção de IgG2a e a diminuição de IgG1 corroboram com o perfil de resposta antileishmanial. De forma geral, o tratamento com Amp/M induziu melhor resposta imune e proteção, tanto 1 quanto 15 dias após o fim do tratamento dos animais.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o sistema Amp/M foi mais efetivo na redução da infecção, baseada no controle da carga parasitária e desenvolvimento de uma resposta imune Th1 e, dessa forma, o produto poderia ser considerado como uma possibilidade para estudos futuros para o tratamento contra a leishmaniose visceral.

Referências bibliográficas

- ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, BOER MD, THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PloS One*. v.7, 2012.
- BARBIÉRI C.L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 28: 329–337.
- BELKAID Y., PICCIRILLO C.A., MENDEZ S., SHEVACH E.M. & SACKS D.L. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 420: 502– 507.
- BHATTACHARYA, P.; DEY R. , DAGUR P.K. et al. Genetically modified live attenuated *Leishmania donovani* parasites induce innate immunity through classical activation of macrophages that direct the Th1 response in mice. *Infectar. Immun.* v. 83, pp. 3800 – 3815, 2015.
- BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2, p. 69, 2012.
- FREITAS, J.C.C. PINHEIRO, D.C.S.N. Leishmaniasis: an approach about the immunoglobulins and cytokines involved in infection and vaccination. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.7, n.3, p.193-204, 2013.
- GOTO, H; LINDOSO, JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* v. 8, p.419-433, 2010.
- ISLAMUDDIN, M; CHOUHAN, G; WANT, M. Y. et al. Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* v. 10, 2016.
- MD, N; ALI. Dynamicity of immune regulation during visceral leishmaniasis. *Indian Natl. Sci. Acad.*, v 80 , pp. 247 - 267, 2014.
- MISHRA, B.B., TIWARI, V.K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem*, v. 46, n. 10, p. 4769-807, 2011.
- MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; RAHAMAN, M. et al. A curative immune profile one week after treatment of Indian kala-azar patients predicts success with a short-course liposomal amphotericin B therapy. *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 4 (2010), p. e764.
- MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 366, p. 1561-1577, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis*, 2019. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>.