

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA**  
**SÉRGIO AROUCA**

**Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromos  
P450 hepáticos em primatas e ratos tratados com antimoniato  
de meglumina**

Karen Friedrich

Orientador

Francisco José Roma Paumgarten

**Tese apresentada à Escola Nacional  
de Saúde Pública, FIOCRUZ, para  
obtenção do título de Doutora em  
Saúde Pública.**

**Rio de Janeiro**

**Abril 2008**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA**  
**SÉRGIO AROUCA**

**Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromos  
P450 hepáticos em primatas e ratos tratados com antimoniato  
de meglumina.**

Karen Friedrich

**Banca examinadora:**

Dr. Norbert Miekeley (PUC-RJ)  
Dr. Gabriel Grimaldi (IOC – FIOCRUZ)  
Dr. Luís Felipe Ribeiro Pinto (UERJ e INCA)  
Dra. Cláudia Serpa (ENSP – FIOCRUZ)  
Dr. Francisco José Roma Paumgartten (ENSP – FIOCRUZ)  
Dra. Rita de Cássia Elias Estrela (INCA)  
Dr. Renato Porrozzini de Almeida (IOC – FIOCRUZ)

**Rio de Janeiro**  
**Abril 2008**

Catálogo na fonte

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

F911e Friedrich, Karen

Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromos P450 hepáticos em primatas e ratos tratados com antimoníato de meglumina. / Karen Friedrich. Rio de Janeiro : s.n., 2008. xxi, 162 p., il., tab., graf.

Orientador: Paumgarten, Francisco José Roma  
Tese de Doutorado apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca.

**1. Leishmaniose-terapia. 2. Meglumina-uso terapêutico.  
3. Macaca mulatta. 4. Cinética. 5. Leite-efeitos de drogas.  
6 Sistema Enzimático do Citocromo P-450. I.Título.**

CDD - 22.ed. – 616.9364

À Marina Cariello Friedrich  
e suas pinceladas coloridas  
pelo mundo.

## AGRADECIMENTOS

À equipe do Laboratório de Leishmaniose (IOC-FIOCRUZ) pela realização das etapas de manutenção, tratamento e coleta das amostras dos macacos Rhesus e também pela proposta do estudo.

À equipe do Laboratório de ICP-MS (PUCRJ) pela quantificação de antimônio nas amostras de macacos e ratos.

Ao Dr. Renato Marchevsky (Biomanguinhos/FIOCRUZ) pela realização da necropsia dos macacos Rhesus.

Ao orientador Francisco Paumgarten.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental.

Ao Thiago Parente, Ana Cecília A. X. de Oliveira, Rosângela Ribeiro de Carvalho, Rodrigo Caruso e Cristina Souza pela imprescindível ajuda e parceria durante a elaboração, execução, formatação e revisão dessa tese.

Pela ajuda em todas as etapas dos estudos com ratos agradeço à Marcia Sarpa e Renato Sampaio Carvalho. Ao Renato devo também a quantificação dos níveis de RNAm.

Aos insubstituíveis: Flávia Vieira, Elaine e Felipe do Laboratório de Química (PUCRJ) e Helen e Renan do Laboratório de Toxicologia Ambiental.

A todos os meus alunos (também professores e cobaias) pelos aprendizados, experimentos, descobertas e emoções compartilhadas.

Aos novos, os velhos, os de sempre e os pra sempre amigos: Flávia, Rosita, Katita, Cristina, Thiago, Luis, Isabella, Tininha e Paula.

E aos que, mais que amigos, foram competentes inesquecíveis e pacientes imprescindíveis: Andréa e Rodrigo.

À minha irmã desbravadora e destemida Marcinha pela onipresença.

Ao Kiko e Betha pela Marina.

Aos meus pais por tudo, por sempre, pelo necessário, pelo bastante, pelo improvável e pelo impossível.

“De tudo ficam três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que precisamos continuar...  
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...  
Portanto, devemos:  
Fazer da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro... “

**Fernando Pessoa**

## RESUMO

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas no mundo uma vez que a indústria farmacêutica não tem investido no desenvolvimento de medidas terapêuticas mais seguras e eficazes. Sendo assim, os antimoniais pentavalentes (AP), apesar de serem antigos, ainda são os medicamentos de escolha para todas as formas clínicas da doença. Embora sejam usados há décadas, o conhecimento é escasso no que se refere aos mecanismos de ação, cinética e perfil toxicológico. O objetivo deste estudo é fornecer informações para essas lacunas. Nós investigamos a cinética do antimoniato de meglumina (AM) em macacos Rhesus; avaliamos a transferência para o leite materno e lactentes quando ratas lactantes foram tratadas com AM; e estudamos a expressão e atividade de citocromos P450 (CYP) hepáticos em ratos machos tratados com AM. Macacos Rhesus foram tratados com injeções diárias intramusculares durante 21 dias consecutivos e os níveis de antimônio no sangue, durante e após o tratamento, foram determinados. Níveis de antimônio residual (24 ou 48 horas) após a última injeção foram maiores em hemácias que no plasma. Tireóide, fígado, baço, vesícula, pulmões, pele e rins apresentaram níveis detectáveis de antimônio 60 dias após o fim do tratamento. Níveis detectáveis de antimônio foram encontrados no leite materno de ratas Wistar tratadas por via subcutânea com AM. As ninhadas das mães tratadas também apresentaram níveis detectáveis de Sb, sugerindo que o antimônio é transferido para o leite e absorvido pelos filhotes. Ratos machos adultos foram tratados com AM (300 mg Sb<sup>V</sup>/ kg peso corpóreo/dia por via subcutânea) ou apenas com o veículo, durante 20 dias. As atividades de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD), benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) erithromicina N-desmetilase (END) (marcadores de CYP1A1/2, CYP2B1/2 e CYP3A, respectivamente) estavam diminuídas nos microsossomos hepáticos de ratos tratados com AM. Uma vez que as atividades de *N*-nitrosodimeilamina desmetilase (NDMA) e anilina 4-hidroxilase (A4H), marcadores de CYP2E1, estavam diminuídas e a de *p*-nitrofenol-hidroxilase (PNPH) estava aumentada, sugerimos que a PNPH no fígado de ratos seja catalisada não somente CYP2E1, mas outras isoformas de CYP. As alterações encontradas e os resultados de *immunoblotting* e PCR *real-time* sugerem que o tratamento com AM altera as atividades de CYP através de mecanismos pós-traducionais.

**Palavras-chave: antimoniato de meglumina, Rhesus, cinética, leite, citocromo P450**

## ABSTRACT

Leishmaniasis is considered as one of the most neglected diseases in the world because the pharmaceutical industry has made no recent effort to develop safer and more effective treatments for it. Thus, pentavalent antimonials (PA), that are rather old medicines, still remain as first choice drugs for all clinical forms of the disease. Although they have been used for decades, knowledge on PA mechanism of action, kinetics and toxicological profile are sparse. The aim of this study is to provide data on these gaps. We investigated the kinetics of meglumine antimoniate (MA) in Rhesus monkeys; evaluated the transfer of antimony to maternal milk and suckling pups when lactating rats were treated with MA; and studied the expression and activity of hepatic microsomal cytochromes P450 (CYP) in male rats treated with MA. Rhesus monkeys treated with daily intramuscular injections of MA for 21 consecutive days, and levels of Sb were determined in the blood during treatment and thereafter until the monkeys were killed. Levels of residual antimony (24 h or 48 h after the last injection) were higher in erythrocytes than in the blood plasma. Thyroid, liver, spleen, gall bladder, lungs, skin, kidney presented detectable levels of antimony 60 days after the end of treatment. Detectable levels of antimony were found in milk from Wistar rats treated subcutaneously with MA. The litter of treated mothers also presented detectable levels of Sb suggesting that antimony is transferred to milk and absorbed by suckling pups. Adult male Wistar rats were treated with MA (300 mg Sb<sup>V</sup>/ kg body weight / day, subcutaneously) or with the vehicle alone for 20 days. The activities of ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD), benzyloxyresorufin-*O*-debenzylase (BROD) erythromycin *N*-demethylase (END) (markers for CYP1A1/2, CYP2B1/2 and CYP3A, respectively) were all reduced in liver microsomes of MA-treated rats. Since *N*-nitrosodimethylamine demethylase (NDMA) and aniline 4-hydroxylase (A4H), markers for CYP2E1, were decreased and *p*-nitrophenol-hydroxylase (PNPH) activity was increased, we suggested that PNPH in the rat liver is catalyzed not only by CYP2E1 but also by other CYP isoforms. The foregoing alterations and data provided by immunoblotting and PCR real-time techniques suggested that treatment with MA affected CYP activities by post-translational mechanisms.

**Key words: meglumine antimoniate, Rhesus, kinetics, milk, cytochrome P450**



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO I. Introdução Geral</b>   | <b>1</b>  |
| <i>I.1. Características gerais das leishmanioses</i>  | <b>2</b>  |
| <i>I.2. Tratamento das leishmanioses</i>  | <b>10</b> |
| <i>I.3. Antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento das leishmanioses</i>                                  | <b>14</b> |
| <i>I.3.1 Histórico do uso do antimônio na medicina</i>  | <b>14</b> |
| <i>I.3.2 Mecanismo de ação dos antimoniais</i>  | <b>16</b> |
| <i>I.3.3 Farmacocinética e toxicidade dos antimoniais pentavalentes</i>   | <b>18</b> |
| <i>I.4. Justificativa do estudo</i>   | <b>21</b> |
| <i>I.5. Objetivos do estudo</i>   | <b>23</b> |
| <br>  |           |
| <b>CAPÍTULO II. Estudo da cinética do antimoniato de meglumina (AM) em macacos Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)</b> | <b>24</b> |
| <br>  |           |
| <i>II.1 Introdução</i>  | <b>25</b> |
| <br>  |           |
| <i>II.2 Objetivos</i>   | <b>27</b> |
| <i>II.2.1 Objetivo geral</i>  | <b>27</b> |
| <i>II.2.2 Objetivos específicos</i>   | <b>27</b> |
| <br>  |           |
| <i>II.3 Materiais e métodos</i>   | <b>28</b> |
| <i>II.3.1 Animais</i>   | <b>28</b> |
| <i>II.3.2 Infecção com <i>Leishmania braziliensis</i></i>   | <b>30</b> |
| <i>II.3.3 Tratamento com antimoniato de meglumina (AM)</i>  | <b>30</b> |
| <i>II.3.4 Coleta das amostras para quantificação de antimônio</i>   | <b>30</b> |
| <i>II.3.5 Necrópsia</i>   | <b>31</b> |
| <i>II.3.6 Lavagem e digestão das amostras de pêlos</i>  | <b>31</b> |
| <i>II.3.7 Processo de abertura (digestão ácida) de amostra de biológicas</i>                                      | <b>32</b> |
| <i>II.3.8 Quantificação de antimônio total</i>  | <b>32</b> |
| <br>  |           |
| <i>II.4 Resultados</i>  | <b>33</b> |
| <i>II.4.1 Concentração de antimônio em pelos</i>  | <b>33</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b><i>II.4.2 Concentração de antimônio em plasma e pool de hemácias</i></b>  | <b>35</b> |
| <b><i>II.4.3 Concentração de antimônio em órgãos de macacos</i></b>  | <b>41</b> |
| <b><i>II.5 Discussão</i></b>   | <b>44</b> |
| <b><i>II.6 Conclusões</i></b>  | <b>49</b> |
| <b>CAPÍTULO III. Estudo da cinética do antimoniato de meglumina (AM) administrado durante a lactação em ratos</b>  | <b>50</b> |
| <b><i>III. 1 Introdução</i></b>  | <b>51</b> |
| <b><i>III.2 Objetivos</i></b>  | <b>53</b> |
| <b><i>III.2.1 Objetivo geral</i></b>   | <b>53</b> |
| <b><i>III.2.2 Objetivos específicos</i></b>  | <b>53</b> |
| <b><i>III.3 Materiais e métodos</i></b>  | <b>54</b> |
| <b><i>III.3.1 Desenho experimental (parte I)</i></b>   | <b>54</b> |
| <b><i>III. 3. 1. 1 Animais</i></b>   | <b>54</b> |
| <b><i>III. 3. 1 .2 Tratamento de ratas lactantes com antimoniato de meglumina ou veículo por via subcutânea</i></b>  | <b>54</b> |
| <b><i>III.3.1.3 Coleta de sangue dos filhotes e sangue e leite materno</i></b>   | <b>56</b> |
| <b><i>III.3.2 Desenho experimental - parte II</i></b>  | <b>56</b> |
| <b><i>III. 3. 2. 1 Animais</i></b>   | <b>56</b> |
| <b><i>III. 3. 2 .2 Tratamento de ratas lactantes com antimoniato de meglumina, ou veículo por via subcutânea</i></b>   | <b>56</b> |
| <b><i>III.3.2.3 Coleta de sangue dos filhotes e sangue e leite materno</i></b>   | <b>57</b> |
| <b><i>III.3.3 Digestão das amostras de sangue e leite e quantificação de antimônio por ICP-MS (Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado)</i></b> | <b>57</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>III.3.4 Análise estatística</b>  | <b>58</b> |
| <b>III.4 Resultados</b>   | <b>59</b> |
| <b>III.4.1 Resultados – parte I</b>   | <b>59</b> |
| <b>III.4.1.1 Pesos corpóreos das mães, filhotes e peso do fígado materno</b>  | <b>59</b> |
| <b>III.4.1.2 Concentração de antimônio total no sangue e no leite maternos e no sangue de filhotes</b>  | <b>61</b> |
| <b>III.4.2 Resultados – parte II</b>  | <b>63</b> |
| <b>III.4.2.1 Peso corpóreo e peso absoluto e relativo dos órgãos das mães e dos filhotes</b>  | <b>63</b> |
| <b>III.4.2.2 Concentração de antimônio total no sangue e leite materno e sangue de filhotes</b>   | <b>65</b> |
| <b>III.5 Discussão</b>  | <b>68</b> |
| <b>III.6 Conclusões</b>   | <b>70</b> |
| <br>  |           |
| <b>CAPÍTULO IV. Avaliação da alteração de citocromos P450 (CYP) em ratos Wistar tratados com antimoniato de meglumina (AM)</b>                              | <b>71</b> |
| <br>  |           |
| <b>IV. 1 Introdução a biotransformação</b>  | <b>72</b> |
| <b>IV. 1. 1 Classificação, estrutura, localização e função das CYP</b>  | <b>75</b> |
| <br>  |           |
| <b>IV. 2 Objetivos</b>  | <b>85</b> |
| <b>IV.2.1 Objetivo geral</b>  | <b>85</b> |
| <b>IV.2. 2 Objetivos específicos</b>  | <b>85</b> |
| <br>  |           |
| <b>IV.3 Materiais e métodos</b>   | <b>86</b> |
| <b>IV.3.1 Animais</b>   | <b>86</b> |
| <b>IV.3.2 Tratamento com antimoniato de meglumina ou veículo</b>  | <b>86</b> |
| <b>IV.3.3 Necrópsia</b>   | <b>86</b> |
| <b>IV.3.4 Digestão das amostras de sangue e fígado e quantificação de antimônio por ICP-MS (Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado)</b> | <b>87</b> |

|  |     |
|--|-----|
| <i>IV.3.5 Preparo de fração microsomal</i>   | 88  |
| <i>IV.3.6 Determinação da concentração de proteína</i>   | 88  |
| <i>IV.3.7 Quantificação da atividade de isoenzimas citocromo P450 hepáticas</i>  | 88  |
| <i>IV.3.7.1 Determinação das atividades de resorufina-O-desalquilases</i>  | 88  |
| <i>IV.3.7.2 Determinação da atividade de p-nitrofenol hidroxilase</i>  | 89  |
| <i>IV.3.7.3 Determinação da atividade de eritromicina-N-desmetilase (END) e N-nitrosodimetilamina-N-desmetilase (NDMA-d)</i> | 90  |
| <i>IV.3.7.4 Determinação da atividade de anilina-4-hidroxilase (A4H)</i>   | 90  |
| <i>IV.3.8 Expressão de proteína por técnica de SDS-PAGE e immunoblotting</i>   | 91  |
| <i>IV.3.9 Análise de expressão gênica por real time RT-PCR</i>   | 93  |
| <i>IV.3.9.1 Extração e quantificação de RNA das amostras de fígado</i>   | 93  |
| <i>IV.3.9.2 Síntese de DNA complementar (DNAc)</i>   | 93  |
| <i>IV.3.9.3 Quantificação relativa dos níveis de RNAm por real time RT-PCR</i>   | 94  |
| <i>IV.3.10 Análise estatística</i>   | 95  |
| <b>IV.4 Resultados</b>   | 96  |
| <i>IV.4.1 Alteração de peso corpóreo e pesos dos órgãos.</i>   | 96  |
| <i>IV.4.2 Concentração de antimônio total no sangue e no fígado</i>  | 98  |
| <i>IV.4.3 Atividade de isoformas de CYP hepáticas</i>  | 99  |
| <i>IV.4.4 Expressão de CYP hepáticas pela técnica de immunoblotting</i>  | 106 |
| <i>IV.4.5 Quantificação dos níveis de RNAm de CYP</i>  | 109 |
| <i>IV.5 Discussão</i>  | 112 |
| <i>IV. 6 Conclusões</i>  | 119 |
| <b>CAPÍTULO V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 120 |
| <b>CAPÍTULO VI. ANEXOS</b>   | 155 |

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Tabela I.1:** Distribuição por diferentes regiões do país dos casos confirmados de leishmaniose cutânea notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) **4**
- Tabela I.2:** Distribuição por diferentes regiões do país dos casos confirmados de leishmaniose visceral notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) **5**
- Figura I.1:** Casos confirmados de leishmaniose cutânea em crianças menores de 10 anos e percentual desses casos em relação ao total para todas as faixas etárias por ano e por região do país. Fonte: DATASUS, 2007 (acesso em 28/12/2007) **6**
- Figura I. 2:** Casos confirmados de leishmaniose visceral em crianças menores de 10 anos e percentual desses casos em relação ao total para todas as faixas etárias por ano e por região do país. Fonte: DATASUS, 2007 (acesso em 28/12/2007) **6**
- Figura I.3:** Ciclo biológico da *Leishmania spp.* (Modificado de CDC, 2007) **9**
- Tabela I.3:** Principais medicamentos com ação leishmanicida **11**
- Figura I.4:** Estruturas químicas dos antimoniais pentavalentes **14**
- Tabela II.1:** Peso corporal e sexo dos macacos (Rhesus) utilizados no estudo farmacocinético do AM e infectados com *L. (V.) braziliensis* **29**
- Figura II.1:** Concentração de antimônio total nos pêlos de cada um dos macacos Rhesus tratados com 5 (a) ou 20 (b) mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia durante 21 dias por via intramuscular. Médias±DP dos dois grupos de tratamento (c). A seta indica o término do tratamento **34**
- Figura II.2:** Níveis de antimônio total (µg/g) (média±DP) em plasma (a) e papa de hemácias (b) em macacos Rhesus tratados com AM nas doses de 5 ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg horas após a primeira injeção por via intramuscular **36**

**Figura II.3:** Concentração de antimônio total ( $\mu\text{g/g}$ ) (média) em plasma (azul) e papa de hemácias (vermelho) de macacos Rhesus tratados com AM nas doses de 5 (a) e 20 (b)  $\text{mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$ , 2, 6, 12 e 24 horas após a primeira injeção por via intramuscular.

37

**Figura II.4:** Níveis residuais de antimônio total ( $\mu\text{g/g}$ ) (média $\pm$ DP) em plasma (a) e em papa de hemácias (b) de macacos Rhesus tratados com 5  $\text{mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$  durante e após o tratamento por via intramuscular (valores individuais). A seta indica o término do tratamento.

38

**Figura II.5:** Níveis residuais de antimônio total ( $\mu\text{g/g}$ ) (média $\pm$ DP) em plasma (a) e em papa de hemácias (b) de macacos Rhesus tratados com 20  $\text{mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$  durante e após o tratamento por via intramuscular (valores individuais). A seta indica o término do tratamento.

39

**Figura II.6:** Concentração de antimônio total ( $\mu\text{g/g}$ ) (média $\pm$ DP) em plasma (azul) e papa de hemácias (vermelho) de macacos Rhesus tratados com AM nas doses de 5 (a) e 20 (b)  $\text{mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$  durante e após o tratamento por via intramuscular. A seta indica o término do tratamento.

40

**Figura II.7:** Concentração de antimônio total nos órgãos removidos de macacos Rhesus tratados ( $n=3$ ) com AM na dose de 5  $\text{mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}/\text{dia}$ , 60 dias após o fim do tratamento. Em destaque os órgãos que apresentaram níveis menores de antimônio. Valores: Média $\pm$ DP.

42

**Figura II.8:** Concentração de antimônio total nos órgãos removidos de macacos Rhesus tratados ( $n=3$ ) com AM na dose de 20  $\text{mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}/\text{dia}$ , 60 dias após o fim do tratamento. Em destaque os órgãos que apresentaram níveis menores de antimônio. Valores: Média $\pm$ DP.

43

**Tabela II.2** Tempo para concentração máxima de antimônio ( $T_{\text{máx}}$ ) em animais tratados com antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina (AM) ou estibogluconato de sódio (ES), por diferentes vias de administração

46

**Figura III. 1** Esquemas de tratamento e coleta das amostras do estudo da cinética do antimônio durante a lactação em ratas tratadas com AM

55

**Figura III. 2** Peso corpóreo (a) e peso absoluto (b) e relativo (c) do fígado de ratas Wistar tratadas com veículo ou 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de AM durante a lactação (média±DP)

60

**Tabela III.1** Médias (±DP) dos pesos corpóreos dos filhotes. Filhotes individuais como unidade de análise

60

**Tabela III.2** Concentração de antimônio (µg/g) (média±DP) no sangue e no leite maternos e no sangue dos filhotes de ratas tratadas com veículo ou 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de antimoniato de meglumina (AM 300) durante 15 dias por via subcutânea.

61

**Figura III. 3** Concentração de antimônio total (média±DP) no sangue e no leite maternos e no sangue de filhotes de ratas Wistar tratadas com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de AM do dia PN1 ao dia PN15 por via subcutânea

62

**Tabela III. 3** Peso corpóreo e pesos absolutos (PA) e relativos (PR) dos órgãos de ratas tratadas via subcutânea durante o período da lactação com veículo (n=6) ou antimoniato de meglumina 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia (AM 300) (n=6)

64

**Tabela III. 4** Peso corpóreo e pesos absolutos e relativos dos órgãos dos filhotes de ratas tratadas via subcutânea durante o período da lactação com veículo (n=21) ou 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de antimoniato de meglumina (AM) (n=23)

65

**Figura III. 4** Concentração de antimônio total (média±DP) no sangue e leite maternos e no sangue de filhotes de ratas Wistar tratadas com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de AM durante a lactação

66

**Tabela III.5** Concentração de antimônio (média±DP) em sangue e leite materno e sangue de filhotes de ratas tratadas com veículo durante 15 dias por via subcutânea ou 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de antimoniato de meglumina (AM 300).

67

**Figura IV.1:** Fases I, II e III de biotransformação de xenobióticos. Modificado de Nakata *et al*, 2006 73

**Figura IV.2:** Reações de oxidação catalisadas por CYP e por outras enzimas de fase I. Fonte: Gibson & Skett, 1994 74

**Figura IV.3:** Estrutura da protoporfirina IX. Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=11967865> (acesso em 27/01/08) 76

**Figura IV.4:** Esquema geral do ciclo catalítico das CYP. Modificado de: Isin & Guengerich, 2007 79

**Tabela IV.1:** Localização e principais substratos de algumas CYP em seres humanos. 81

**Figura IV.5:** Contribuição de CYP no metabolismo de medicamentos. Fonte: Guengerich, 2006 83

**Tabela IV.2.** Anticorpos primários utilizados para o estudo de expressão de CYP 1A1 e CYP 3A em fígado de ratos tratados com AM 92

**Tabela IV.3:** Peso corpóreo (g) e pesos absolutos (g) e relativos (%) dos órgãos de ratos machos tratados com veículo, 50, 150 ou 300 mgSbV/kg/dia durante 20 dias por via subcutânea 97

**Figura IV.6:** Concentração de antimônio em sangue total e fígado em ratos Wistar tratados com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose 98

**Figura IV.7:** Atividade de etoxiresorufina-*O*-desalquilase (EROD), metoxiresorufina-*O*-desalquilase (MROD), benziloxiresorufina-*O*-desalquilase (BROD) e pentoxiresorufina-*O*-desalquilase (PROD) em fígados de ratos Wistar tratados por via subcutânea com o veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias e sacrificados 24 horas após a última dose. Valores: média ±DP; diferenças (p<0,05)



detectadas por Anova seguida do teste *post hoc Tukey*: a≠veículo; b≠50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c≠150 mg Sb<sup>V</sup>/kg **100**

**Figura IV.8:** Atividade de eritromicina *N*-desmetilase em fígados de ratos Wistar tratados com veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose. Valores: média ±DP; diferenças (p<0,05) detectadas por Anova seguida do teste *post hoc Tukey*: a≠veículo; b≠50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c≠150 mg Sb<sup>V</sup>/kg **101**

**Figura IV.9:** Atividade de anilina 4-hidroxilase em fígados de ratos Wistar tratados com veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose. Valores: média ±DP; diferenças (p<0,05) detectadas por Anova seguida do teste *post hoc Tukey*: a≠veículo; b≠50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c≠150 mg Sb<sup>V</sup>/kg **103**

**Figura IV.10:** Atividade de *N*-nitrosodimetilana desmetilase em fígados de ratos Wistar tratados com veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose. Valores: média ±DP; diferenças (p<0,05) detectadas por Anova seguida do teste *post hoc Tukey*: a≠veículo; b≠50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c≠150 mg Sb<sup>V</sup>/kg **104**

**Figura IV.11:** Atividade de p-nitrofenol hidroxilase em fígados de ratos Wistar tratados com veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose. Valores: média ±DP; diferenças (p<0,05) detectadas por Anova seguida do teste *post hoc Tukey*: a≠veículo; b≠50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c≠150 mg Sb<sup>V</sup>/kg **105**

**Figura IV. 12** Níveis de proteínas de isoformas CYP1A (expressos em unidades arbitrárias de Densidade Óptica (DO)) de ratos tratados por 20 dias com veículo e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de AM. Os painéis (a), (b) e (c) referem-se a diferentes animais (n=12/grupo) **107**

**Figura IV. 13** Níveis de proteínas de isoformas CYP3A (expressos em unidades arbitrárias de Densidade Óptica (DO)) de ratos tratados por 20 dias com veículo e 300

mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de AM. Os painéis (a), (b) e (c) referem-se à diferentes ratos (n=12/grupo) **108**

**Figura IV.14:** Curvas de amplificação das sondas de CYP 1A1, 1A2 e 2E1 (fluorescência *versus* nº de ciclos) utilizando o sistema *Taqman* **110**

**Figura IV.15:** Quantificação relativa de RNAm de CYP 2E1 (a), CYP 1A2 (b) e CYP 1A1 (c) no fígado de ratos tratados com antimoniato de meglumina por 20 dias **111**

**Tabela IV.4:** Alteração das atividades catalíticas de CYP no fígado de ratos tratados com AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea **113**

**Tabela IV.5:** Alteração dos níveis de RNAm e a proteína de CYP em fígados de ratos tratados com 50 (AM 50), 150 (AM 150) e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia por via subcutânea (AM 300) durante 20 dias **114**

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo I:** Concentração de antimônio total em plasma ( $\mu\text{g/g}$ ) de macacos Rhesus após a primeira injeção intramuscular com as doses de 5 ou 20 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$  de antimoniato de meglumina. **156**

**Anexo II:** Concentração de antimônio total em papa de hemácias ( $\mu\text{g/g}$ ) de macacos Rhesus após a primeira injeção intramuscular com as doses de 5 ou 20 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$  de antimoniato de meglumina. **157**

**Anexo III:** Concentração de antimônio total em papa de hemácias de macacos Rhesus tratados com 5 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{kg}/\text{dia}$  de antimoniato de meglumina durante 21 dias consecutivos. **158**

**Anexo IV:** Concentração de antimônio total em papa de hemácias de macacos Rhesus tratados com 20 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{kg}/\text{dia}$  de antimoniato de meglumina durante 21 dias consecutivos. **159**

**Anexo V:** Concentração de antimônio total em plasma de macacos Rhesus tratados com 5 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{kg}/\text{dia}$  de antimoniato de meglumina durante 21 dias consecutivos. **160**

**Anexo VI:** Concentração de antimônio total em plasma de macacos Rhesus tratados com 20 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{kg}/\text{dia}$  de antimoniato de meglumina durante 21 dias consecutivos. **161**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- a.c.** – antes de Cristo
- A4H** – anilina-4-hidroxilase
- ABC** – *ATP-binding cassette*
- AM** – antimoniato de meglumina
- ANOVA** – análise de variância
- AP** – antimonial pentavalente
- ATP** – adenosina trifosfato
- BROD** – benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase
- BSA** – albumina sérica bovina
- CDC** – Centers for Disease Control and Prevention
- CEUA-FIOCRUZ** – Comitê de Ética no Uso de Animais – FIOCRUZ
- CYP** – citocromo P450
- DALY** – *disability adjusted life year*
- DEPC** – dietil-pirocarbonato
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DNAc** – DNA complementar
- dNTP** – desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DO** – densidade óptica
- DP** – desvio-padrão
- END** – eritromicina-*N*-desmetilase
- EROD** – etoxiresorufina-*O*-desetilase
- ES** – estibogluconato de sódio
- et al* – *et alli* (e outros)
- GSH** – glutatona reduzida
- HO** – heme-oxigenase
- HPA** – hidrocarboneto policíclico aromático
- IM** – intramuscular
- ICP-MS** - Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
- IV** - intravenosa
- MROD** - metoxiresorufina-*O*-desmetilase
- NADPH** – nicotinamida adenina nucleotídeo oxidase
- ND** – não determinado
- NDMA-d** – nitrosodimetilamina-*N*-desmetilase

**NI** – não-infectado

**NOAEL** – *no observed adverse effect level* (nível de dose onde não foi observado efeito adverso)

**NPR** – NADPH-citocromo P450 oxidoreductase

**NS** – não significativo

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OMS-TDR** - Organização Mundial da Saúde – *Tropical Diseases Research*

**PA** – peso absoluto

**PGPA** – glicoproteína P

**PN** – pós-natal

**PNPH** – *p*-nitrofenol hidroxilase

**PR** – peso relativo

**PROD** - pentoxiresorufina-*O*-despentilase

**PUCRIO** – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

**RT-PCR** – reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

**SC** – subcutânea

**SINAN** – Sistema de Agravos de Notificação

**TBS** – salina tamponada com Tris

**TGI** – trato gastrointestinal

**TTBS** - salina tamponada com Tris e Tween

## **CAPÍTULO I. Introdução Geral**

## ***1.1. Características gerais das leishmanioses***

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que é dividido em dois subgêneros distintos: *L. (Leishmania)* spp. e *L. (Viannia)* spp. Esses protozoários pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. A forma promastigota do parasita é transmitida pela picada de fêmeas de flebotomíneos (gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*) (WHO, 2007). Os hospedeiros vertebrados incluem o homem, raposas, alguns marsupiais e o cão doméstico. As manifestações clínicas da leishmaniose podem ser reunidas em dois grandes grupos: as formas cutâneas (cutânea, mucocutânea e cutânea difusa) e a forma visceral.

A forma cutânea propriamente dita, que na maioria dos casos é curada espontaneamente (Berman, 1988), é caracterizada por lesões ulcerativas no local da picada do mosquito, geralmente em locais expostos como rosto, pescoço, braços e pernas (FUNASA, 2000). A leishmaniose cutânea pode ser causada por diversas espécies de *Leishmania*, tais como: *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. amazonensis*. A forma mucocutânea, geralmente causada por *L. braziliensis*, é caracterizada por lesões nas membranas mucosas do nariz, boca e faringe. Esta manifestação pode surgir a partir de metástases de lesões cutâneas ou ser secundária a tratamentos inadequados de outras formas de leishmaniose. A forma cutânea difusa, caracterizada por lesões dérmicas não ulcerativas, pode ser causada pela *L. mexicana* e, geralmente, está associada a respostas imunológicas ineficazes. De maneira geral, as lesões cutâneas não levam a morte, mas podem causar cicatrizes e sérias deformidades além de transtornos como a rejeição social (Murray, 2004)

A forma mais grave de leishmaniose é a visceral, também conhecida como calazar, causada por *L. donovani*, *L. infantum* (ou *L. chagasi*). Nesse caso, o período de incubação pode ser de meses ou até anos e a doença pode apresentar elevada mortalidade quando não tratada adequadamente.

As manifestações clínicas da doença podem ser muito heterogêneas e relacionadas às regiões endêmicas e fatores inter-individuais do hospedeiro, como: idade, estado nutricional, imunidade inata, resposta imune T-dependente e perfil imunogenético (Davies, 1999, Davies, 2000, Louzir, 1998; Murray *et al.*, 2005). As características genéticas dos parasitas inoculados também são determinantes da virulência, da patogênese, da resistência aos medicamentos leishmanicidas e da

sobrevivência do hospedeiro (Kedzierski, 2006; Murray, 2005; Turco, 2001; Barr, 2001; Perez-Victoria, 2003<sup>a</sup>).

As leishmanioses são endêmicas em 88 países, dos quais 72 estão em processo de desenvolvimento. Aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose cutânea estão distribuídos no Irã, no Afeganistão, na Síria, na Arábia Saudita, no Brasil e no Peru e mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (WHO-TDR, 2007). Anualmente são registrados 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos de leishmaniose visceral e o número de óbitos chega a 57 mil. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam sob risco de infecção e o DALY<sup>1</sup> é de 2,36 milhões de anos (WHO-TDR, 2007).

No Brasil, no período de 2001 a 2005, foram registrados 140.999 casos de leishmaniose cutânea (**Tabela I.1 e Figura I.1**) e 14.662 casos de leishmaniose visceral, principalmente no Maranhão, Minas Gerais, Bahia, Ceará, Piauí, Pará e Tocantins (**Tabela I.2 e Figura I.2**) (DATASUS, 2007).

Nas últimas décadas o perfil de distribuição da leishmaniose vem se modificando, passando a ocorrer não somente em áreas rurais e silvestres, mas também nas áreas domiciliares ou peri-domiciliares de grandes centros urbanos (FUNASA, 2000; Arias *et al.*, 1996; Werneck *et al.*, 2002). Fatores ambientais, como desmatamento, construção de represas, novos sistemas de irrigação, urbanização e migração de população não-imune para áreas endêmicas são alguns dos fatores associados à expansão geográfica da doença (Desjeux, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO-TDR), as principais estratégias de controle da leishmaniose envolvem o diagnóstico e registro de casos, controle de vetores e de reservatórios animais como marsupiais didelfídeos, raposas e cães, principais fontes de infecção nas áreas silvestres e urbanas no Brasil (FUNASA, 2000). No Brasil a *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da leishmaniose visceral humana e canina (Grimaldi, 1989), entretanto medidas de controle de flebotomíneos e de cães nem sempre são eficazes contra surtos epidêmicos (Dietze, 1997; Werneck *et al.*, 2002). As atividades de educação sanitária também são preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, integradas sempre a outras ações voltadas para o controle da doença (FUNASA, 2000).

---

<sup>11</sup> DALY - (*disability-adjusted life-year* – medida que combina a mortalidade e incapacidade provocadas pela doença e seu impacto na saúde da população) (WHO-TDR, 2007).



**Tabela I.1:** Distribuição por diferentes regiões do país dos casos confirmados de leishmaniose cutânea notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

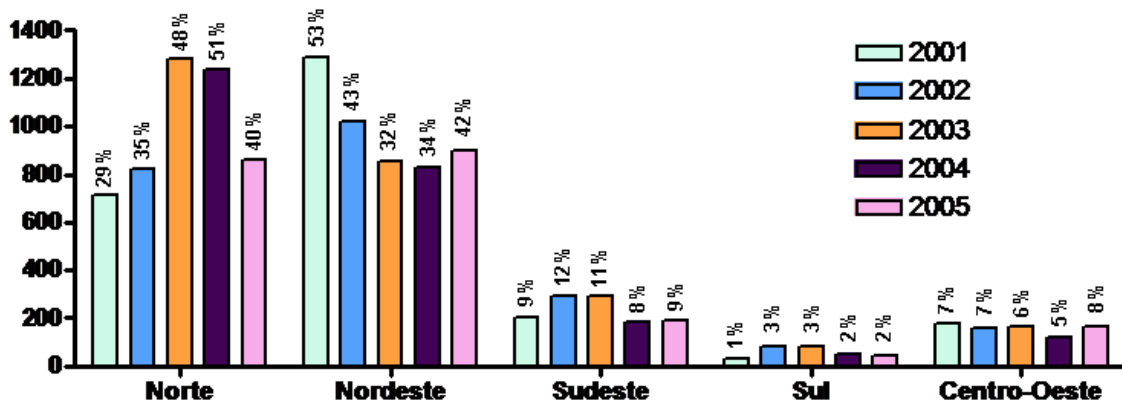
|                     |                                 | ANO DE NOTIFICAÇÃO |              |              |              |              |
|---------------------|---------------------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                     |                                 | 2001               | 2002         | 2003         | 2004         | 2005         |
| <b>NORTE</b>        | <b>Acre</b>                     | 878                | 958          | 1394         | 1502         | 1303         |
|                     | <b>Amapá</b>                    | 128                | 325          | 569          | 1146         | 571          |
|                     | <b>Amazonas</b>                 | 2503               | 1967         | 3706         | 2228         | 1953         |
|                     | <b>Pará</b>                     | 2645               | 3876         | 4906         | 5437         | 4196         |
|                     | <b>Rondônia</b>                 | 1577               | 1812         | 2020         | 2097         | 1658         |
|                     | <b>Roraima</b>                  | 471                | 442          | 301          | 159          | 282          |
|                     | <b>Tocantins</b>                | 603                | 606          | 619          | 537          | 486          |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>8805</b>        | <b>9986</b>  | <b>13515</b> | <b>13106</b> | <b>10449</b> |
| <b>NORDESTE</b>     | <b>Alagoas</b>                  | 92                 | 82           | 104          | 59           | 51           |
|                     | <b>Bahia</b>                    | 1709               | 1949         | 2030         | 1703         | 2011         |
|                     | <b>Ceará</b>                    | 2731               | 2053         | 1306         | 2089         | 1927         |
|                     | <b>Maranhão</b>                 | 5706               | 4474         | 3839         | 3034         | 3340         |
|                     | <b>Paraíba</b>                  | 51                 | 70           | 53           | 70           | 67           |
|                     | <b>Pernambuco</b>               | 528                | 583          | 570          | 687          | 325          |
|                     | <b>Piauí</b>                    | 171                | 156          | 120          | 128          | 240          |
|                     | <b>Rio Grande do Norte</b>      | 8                  | 8            | 8            | 11           | 9            |
|                     | <b>Sergipe</b>                  | 97                 | 57           | 10           | 10           | 8            |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>11093</b>       | <b>9432</b>  | <b>8040</b>  | <b>7791</b>  | <b>7978</b>  |
| <b>CENTRO-OESTE</b> | <b>Distrito Federal</b>         | 33                 | 32           | 67           | 55           | 30           |
|                     | <b>Goiás</b>                    | 459                | 441          | 497          | 441          | 524          |
|                     | <b>Mato Grosso</b>              | 4042               | 4064         | 4284         | 3684         | 3651         |
|                     | <b>Mato Grosso do Sul</b>       | 407                | 295          | 236          | 194          | 133          |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>4941</b>        | <b>4832</b>  | <b>5084</b>  | <b>4374</b>  | <b>4338</b>  |
| <b>SUDESTE</b>      | <b>Espirito Santo</b>           | 348                | 213          | 225          | 146          | 202          |
|                     | <b>Minas Gerais</b>             | 1215               | 1628         | 1784         | 1496         | 1735         |
|                     | <b>Rio de Janeiro</b>           | 196                | 280          | 235          | 217          | 315          |
|                     | <b>São Paulo</b>                | 508                | 816          | 1021         | 617          | 467          |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>2267</b>        | <b>2937</b>  | <b>3265</b>  | <b>2476</b>  | <b>2719</b>  |
| <b>SUL</b>          | <b>Paraná</b>                   | 481                | 922          | 883          | 550          | 432          |
|                     | <b>Rio Grande do Sul</b>        | 4                  | 21           | 15           | 13           | 10           |
|                     | <b>Santa Catarina</b>           | 11                 | 15           | 24           | 19           | 88           |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>496</b>         | <b>958</b>   | <b>922</b>   | <b>582</b>   | <b>530</b>   |
|                     | <b>REGIÃO IGNORADA</b>          | <b>44</b>          | <b>20</b>    | <b>9</b>     | <b>10</b>    | <b>0</b>     |
|                     | <b>Total de casos no Brasil</b> | <b>27646</b>       | <b>28165</b> | <b>30835</b> | <b>28339</b> | <b>26014</b> |

Fonte: DATASUS, 2007 (acesso em 28/12/2007)

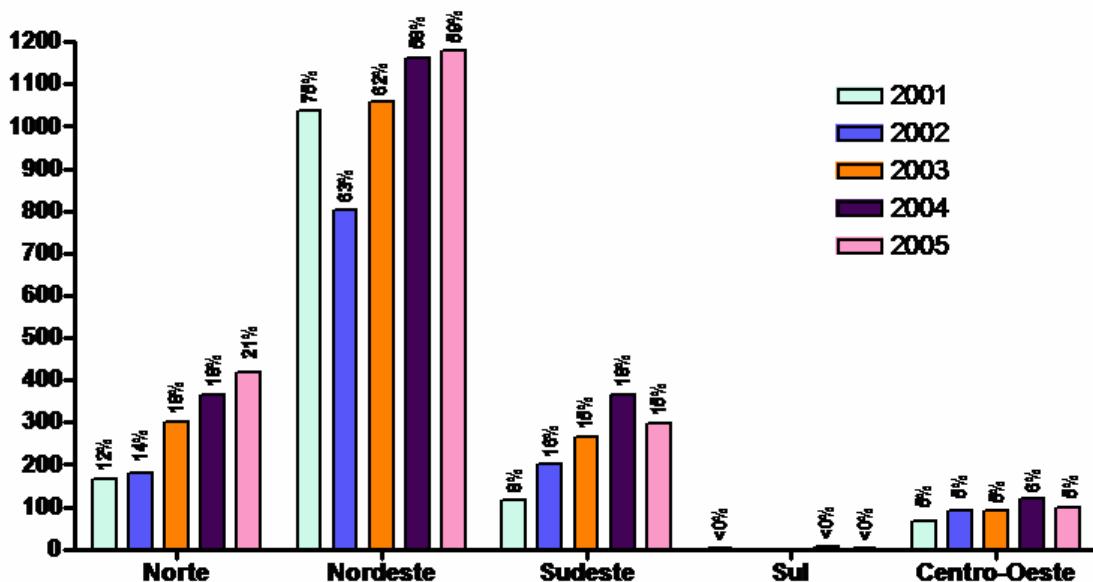
**Tabela I.2:** Distribuição por diferentes regiões do país dos casos confirmados de leishmaniose visceral notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

|                     |                                 | ANO DE NOTIFICAÇÃO |             |             |             |             |
|---------------------|---------------------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                     |                                 | 2001               | 2002        | 2003        | 2004        | 2005        |
| <b>NORTE</b>        | <b>Acre</b>                     | -                  | -           | -           | -           | -           |
|                     | <b>Amapá</b>                    | 1                  | 0           | 0           | 0           | 0           |
|                     | <b>Amazonas</b>                 | 0                  | 3           | 0           | 0           | 1           |
|                     | <b>Pará</b>                     | 139                | 129         | 187         | 358         | 434         |
|                     | <b>Rondônia</b>                 | 0                  | 0           | 0           | 2           | 0           |
|                     | <b>Roraima</b>                  | 4                  | 8           | 10          | 16          | 12          |
|                     | <b>Tocantins</b>                | 119                | 184         | 236         | 151         | 172         |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>263</b>         | <b>324</b>  | <b>433</b>  | <b>527</b>  | <b>619</b>  |
| <b>NORDESTE</b>     | <b>Alagoas</b>                  | 229                | 116         | 49          | 55          | 58          |
|                     | <b>Bahia</b>                    | 278                | 242         | 294         | 405         | 449         |
|                     | <b>Ceará</b>                    | 225                | 224         | 200         | 286         | 384         |
|                     | <b>Maranhão</b>                 | 487                | 532         | 743         | 606         | 558         |
|                     | <b>Paraíba</b>                  | 94                 | 22          | 29          | 28          | 29          |
|                     | <b>Pernambuco</b>               | 222                | 84          | 75          | 82          | 87          |
|                     | <b>Piauí</b>                    | 123                | 125         | 254         | 349         | 304         |
|                     | <b>Rio Grande do Norte</b>      | 153                | 63          | 60          | 53          | 47          |
|                     | <b>Sergipe</b>                  | 39                 | 29          | 18          | 31          | 43          |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>1850</b>        | <b>1437</b> | <b>1722</b> | <b>1895</b> | <b>1959</b> |
| <b>CENTRO-OESTE</b> | <b>Distrito Federal</b>         | 0                  | 0           | 0           | 10          | 9           |
|                     | <b>Goiás</b>                    | 18                 | 17          | 20          | 16          | 13          |
|                     | <b>Mato Grosso</b>              | 17                 | 8           | 14          | 19          | 20          |
|                     | <b>Mato Grosso do Sul</b>       | 89                 | 178         | 187         | 229         | 200         |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>124</b>         | <b>203</b>  | <b>221</b>  | <b>274</b>  | <b>242</b>  |
| <b>SUDESTE</b>      | <b>Espírito Santo</b>           | 7                  | 0           | 4           | 4           | 4           |
|                     | <b>Minas Gerais</b>             | 137                | 290         | 341         | 615         | 491         |
|                     | <b>Rio de Janeiro</b>           | 4                  | 1           | 2           | 2           | 2           |
|                     | <b>São Paulo</b>                | 83                 | 124         | 179         | 96          | 160         |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>231</b>         | <b>415</b>  | <b>526</b>  | <b>717</b>  | <b>657</b>  |
| <b>SUL</b>          | <b>Paraná</b>                   | 3                  | 2           | 1           | 3           | 3           |
|                     | <b>Rio Grande do Sul</b>        | 0                  | 0           | 1           | 0           | 1           |
|                     | <b>Santa Catarina</b>           | 0                  | 0           | 0           | 2           | 0           |
|                     | <b>Total de casos</b>           | <b>3</b>           | <b>2</b>    | <b>2</b>    | <b>5</b>    | <b>4</b>    |
|                     | <b>REGIÃO IGNORADA</b>          | <b>6</b>           | <b>0</b>    | <b>1</b>    | <b>0</b>    | <b>0</b>    |
|                     | <b>Total de casos no Brasil</b> | <b>2477</b>        | <b>2381</b> | <b>2905</b> | <b>3418</b> | <b>3481</b> |

Fonte: DATASUS, 2007 (acesso em 28/12/2007)



**Figura I.1:** Casos confirmados de leishmaniose cutânea em crianças menores de 10 anos e percentual desses casos em relação ao total para todas as faixas etárias por ano e por região do país. Fonte: DATASUS, 2007 (acesso em 28/12/2007).



**Figura I. 2:** Casos confirmados de leishmaniose visceral em crianças menores de 10 anos e percentual desses casos em relação ao total para todas as faixas etárias por ano e por região do país. Fonte: DATASUS, 2007 (acesso em 28/12/2007).

O ciclo biológico da leishmania envolve uma fase no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo), em que ocorre a transformação da forma amastigota em promastigota. A outra fase ocorre no hospedeiro vertebrado (homem e outros animais), em que a forma promastigota se transforma em amastigota (**Figura I.3**).

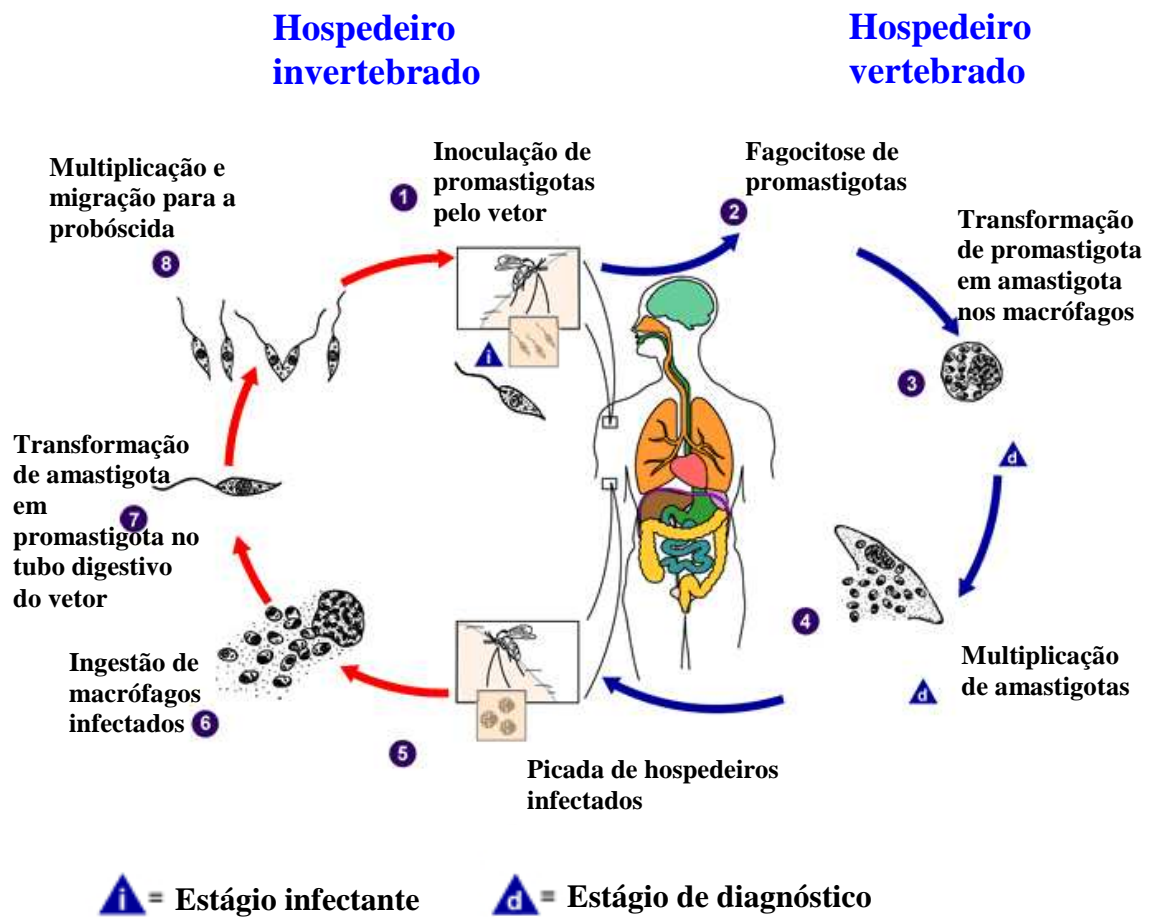
O inseto adquire as formas amastigotas, presentes nos macrófagos, na linfa intersticial, ou ainda, no sangue circulante e no interior de monócitos dos hospedeiros vertebrados (homem e outros animais) (Chang *et al.*, 1985). No tubo digestivo do flebotomo ocorre a transformação em promastigotas (Walters *et al.*, 1989) - estágio flagelado e infectante da leishmania – que, no momento da picada, são regurgitados e introduzidos na derme do hospedeiro. Os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos ocorrendo então a transformação em amastigota. A partir deste momento, multiplicam-se por divisão binária dentro de vacúolos fagolisossomais das células do hospedeiro (Lewis & Peter, 1977; Chang, 1979). Após a multiplicação os macrófagos se rompem liberando grande número de parasitas que invadem outras células e podem, dessa maneira, atingir outros locais do organismo. Outras células do sistema fagocítico mononuclear, como células reticulares e macrófagos do baço, medula óssea, linfonodos e células de Kupffer do fígado, também podem ser parasitadas na leishmaniose visceral. O local de disseminação é determinado por características do parasita, como sensibilidade à temperatura (Reithinger *et al.*, 2002), tropismo pelo tecido (Zhang *et al.*, 2003) e capacidade de imunoevasão e persistência (McDowell *et al.*, 2002; Sacks & Sher, 2002). As espécies *L. donovani* e *L. infantum* são mais viscerotrópicas do que as outras espécies de *Leishmania*.

Nas últimas décadas foram identificadas novas formas de transmissão da leishmaniose visceral, como, por exemplo, a transmissão de formas amastigotas presentes em agulhas, durante a transfusão de sangue, na gravidez e a transmissão por transplante de órgãos (Cruz *et al.*, 2002; Pagliano *et al.*, 2006; Dey & Singh, 2006; Basset *et al.*, 2005).

Os métodos de diagnóstico mais utilizados envolvem a identificação por microscopia das formas amastigotas; em amostras de tecidos (biópsia) como linfonodos, medula óssea e baço, ou na própria lesão (leishmaniose cutânea); e o isolamento e crescimento do parasita em cultura. Por ser mais sensível, e pela indisponibilidade de outras técnicas, o esfregaço do baço é considerado o “padrão ouro” para o diagnóstico de leishmaniose visceral (Singh *et al.*, 2006<sup>a</sup>). Esses procedimentos apresentam algumas desvantagens, pois não são muito sensíveis, demandam tempo e técnicos bem treinados,

e, no caso da leishmaniose visceral, podem ser invasivos, (Piarroux *et al.*, 1994; Reed, 1996). Outras técnicas de diagnóstico, como método de aglutinação direta, ELISA, *immunoblotting* e PCR são mais sensíveis (Millesimo *et al.*, 1996), mas nem sempre estão disponíveis para o uso em larga escala (CDC, 2007).

O diagnóstico preciso dos casos é essencial, não só para o tratamento adequado, mas também para obter dados confiáveis para o desenvolvimento de estratégias públicas de controle da doença e para a manutenção de níveis baixos de prevalência e incidência (WHO, 2007).



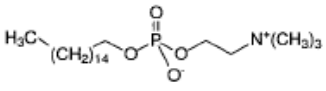
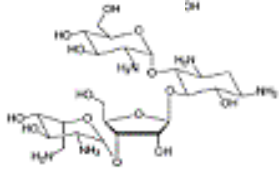
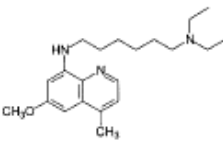
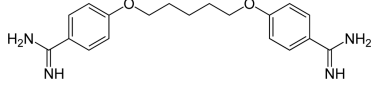
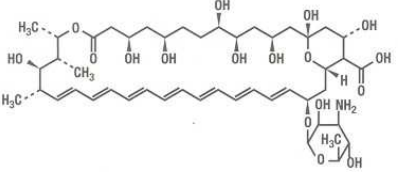
**Figura I.3:** Ciclo biológico da *Leishmania* spp. (Modificado de CDC, 2007)

## ***1.2. Tratamento das leishmanioses***

As manifestações cutâneas de leishmaniose quase sempre são auto-curativas. Contudo, o tratamento pode ser recomendado para acelerar o processo de cura nos casos de persistência das lesões ou, ainda, a fim de evitar disseminação e/ou diminuir as cicatrizes (Blum *et al.*, 2004; Weina *et al.*, 2004). Já nos casos de leishmaniose mucocutânea ou visceral, o tratamento deve ser sempre realizado, uma vez que essas formas da doença possuem alta morbidade e podem levar a morte dos pacientes (Collin *et al.*, 2004; Davidson, 1998).

Os medicamentos com ação leishmanicida mais citados na literatura são: a anfotericina B e suas formulações lipídicas, a pentamidina, a sitamaquina, a miltefosina, a paromomicina e os antimoniais pentavalentes (**Tabela I.3**). Outras substâncias também já foram estudadas quanto ao potencial leishmanicida, mas ainda encontram-se na fase de desenvolvimento e de testes clínicos para esta indicação, tais como: o cetoconazol (Navin *et al.*, 1992), os bifosfonatos (Rodriguez *et al.*, 2002; Yardley *et al.*, 2002), o alopurinol (alternativa para tratamento da leishmaniose canina) (Koutinas *et al.*, 2001), a Licocalcona A (extraído de uma planta chinesa) (Zhai *et al.*, 1999), os alcalóides de derivados quinolínicos (extraído da planta boliviana *Galipea longiflora*) (Fournet *et al.*, 1996) e os flavonóides da planta *Kalanchoe pinnata* (Da Silva *et al.*, 1995; Muzitano *et al.*, 2006; Torres-Santos *et al.*, 2003).

**Tabela I.3:** Principais medicamentos com ação leishmanicida.

| Descrição/fórmula estrutural   | Mecanismo de ação   | Efeitos adversos   |
|--|---|--|
| <p>MILTEFOSINA<br/>(hexadecilfosfolina (uso oral))</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>derivado alquilfosfolípido com atividade antineoplásica</li> </ul>  | <p>Modulação de receptores, metabolismo do inositol, ativação de fosfolipase, proteína quinase C e apoptose (Maly <i>et al.</i>, 1995; Verma &amp; Dey, 2004; Luxe <i>et al.</i>, 2000; Paris <i>et al.</i>, 2004).</p>   | <p>Distúrbios gastrointestinais, nefrotoxicidade, teratogenicidade (Sundar <i>et al.</i>, 1999; 2000; Soto <i>et al.</i>, 2007)</p>  |
| <p>PAROMOMICINA (aminosidina)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>antibiótico aminoglicosídeo</li> </ul>   | <p>Indução de disfunções respiratórias e despolarização de membranas mitocondriais (Maarouf <i>et al.</i>, 1995; 1997)</p>  | <p>Edema, prurido, irritação local (Soto <i>et al.</i>, 1995; Armijos <i>et al.</i>, 2004)</p>                                       |
| <p>SITAMAQUINA</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>derivado da 8-aminoquinolina</li> </ul>    | <p>Alteração do ciclo redox (Croft <i>et al.</i>, 2006) e cadeia transportadora de elétrons (Yeates, 2002); aumento produção de óxido nítrico (Buates &amp; Matlashewski, 1999) ?</p>   | <p>Nefropatia, metahemoglobina (Dietze <i>et al.</i>, 2001; Bhattacharya <i>et al.</i>, 2004).</p>                                   |
| <p>PENTAMIDINA</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>diamidina aromática</li> </ul>    | <p>Biossíntese de poliamina e potencial de membrana mitocondrial (Bray <i>et al.</i>, 2003), ligação ao cinetoplasto de DNA (Fries &amp; Fairlamb, 2003) inibição da síntese depoliaminas (Brochu <i>et al.</i>, 2003) ?</p>  | <p>Cardiotoxicidade, diabetes mellitus insulina dependente irreversível e morte (Thakur <i>et al.</i>, 1991).</p>                    |
| <p>ANFOTERICINA B</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>antibiótico antifúngico isolado de <i>Streptomyces nodosus</i></li> </ul>                          | <p>Afinidade seletiva por ergosterol presentes na membrana do parasita (Goad <i>et al.</i>, 1984) e as formas lipídicas apresentam maior facilidade de chegada em macrófagos parasitados (Sundar <i>et al.</i>, 2000, 2004)</p>   | <p>Febre alta, tromboflebite, miocardite, disfunção renal e morte.</p>   |
| <p>ANTIMONIAIS<br/>PENTAVALENTES</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Antimoniato de <i>n</i>-metil glucamina (antimoniato de meglumina ou Glucantime®)</li> <li>Estibogluconato de sódio (Pentostam®)</li> </ul>                            | <p>Alteração do metabolismo energético, inibição da glicólise e β-oxidação de ácidos graxos e topoisomerases (Berman <i>et al.</i>, 1985; Berman <i>et al.</i>, 1987; Lucumi <i>et al.</i>, 1998) fragmentação do DNA (Serenio <i>et al.</i>, 2001, Sudhandiran &amp; Shaha, 2003) e alteração do transporte de purinas pré-formadas (Carter <i>et al.</i>, 2000)</p> | <p>Nefrotoxicidade (Veiga <i>et al.</i> 1985), cardiotoxicidade hepatotoxicidade, embriotoxicidade (Miranda <i>et al.</i>, 2006)</p> |

? medicamentos para os quais os mecanismos de ação não estão bem esclarecidos.



Entre os medicamentos utilizados na clínica, a anfotericina B é eficaz, mas muito tóxica e tem sido utilizada principalmente na região de Bihar na Índia (Sundar & Raí, 2002; Sundar *et al.*, 2003) onde foram descritos casos de resistência ao antimônio pentavalente (Sundar, 2001; Singh *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2007). Formulações lipídicas (lipossomos) da anfotericina B (*e.g.* Ambisome<sup>®</sup>, Abelcet<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup>) foram desenvolvidas a fim de diminuir a toxicidade e facilitar a captação pelos macrófagos (Sundar & Chatterjee, 2006). Essas formulações alternativas já foram utilizadas com elevado percentual de cura na Europa, na América do Sul, no Quênia e na Índia (Berman *et al.*, 1998; Thakur *et al.*, 1996; Sundar *et al.*, 2002; Sundar *et al.*, 2003; Murray, 2004). Entretanto, a longa meia-vida dessas formulações aumenta a probabilidade de aparecimento de resistência do parasita (Croft *et al.*, 2006). A formulação lipossomal da anfotericina B é utilizada para o tratamento da leishmaniose visceral somente na Europa (Syriopoulou *et al.*, 2003; Gradoni *et al.*, 2004; Cascio *et al.*, 2004) porque, apesar da alta eficácia e menor toxicidade, o elevado custo restringe o seu uso em larga escala nos países em desenvolvimento (Sundar & Chatterjee, 2006).

A pentamidina foi introduzida como leishmanicida em 1952 e, desde então, foi utilizada para o tratamento das diferentes formas de leishmaniose. Ela foi proposta como medicamento de segunda escolha nos casos de resistência que ocorreram na Índia, mas a elevada toxicidade e a baixa eficácia (Jha, *et al.*, 1991; Jha, 1983; Sundar *et al.*, 2001) levaram a suspensão do uso naquele país (Ouellette *et al.*, 2004).

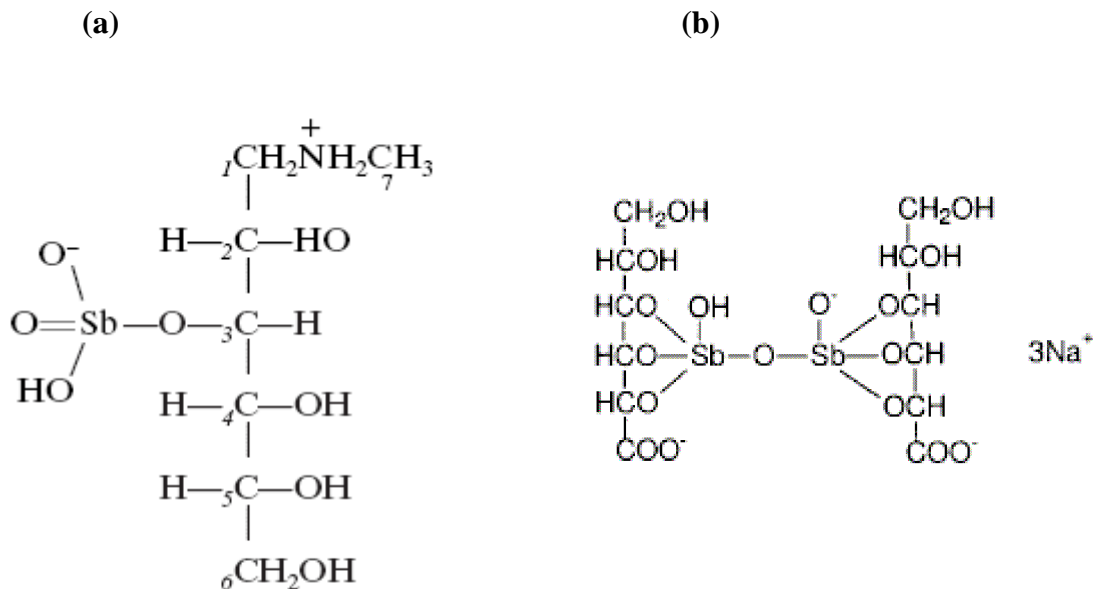
A sitamaquina é um análogo da 8-aminoquinolina desenvolvido para ser uma alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral como medicamento por via oral (Chapman *et al.*, 1979; White *et al.*, 1989). Em estudos clínicos de fase I e II o percentual de cura da leishmaniose visceral foi de aproximadamente 80% no Quênia (Sherwood *et al.*, 1994; Wasunna *et al.*, 2005), enquanto no Brasil (67% de casos de cura) não houve correlação entre a dose e a resolução da doença (Dietze *et al.*, 2001). Alguns efeitos adversos como nefrotoxicidade e a metahemoglobinemia foram observados (Dietze *et al.*, 2001; Jha *et al.*, 2005; Wasunna *et al.*, 2005).

Entre os candidatos a medicamentos leishmanicidas desenvolvidos mais recentemente, a miltefosina se mostrou o mais promissor (Croft *et al.*, 2006; Sundar *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2007). O medicamento foi registrado para o uso contra a leishmaniose visceral na Índia (2002) (Sundar *et al.*, 2003; Bhattacharya *et al.*, 2004), na Alemanha (2004) e na Colômbia (2005), mas não foi eficaz contra a espécie *L.*

*braziliensis* (Soto *et al.*, 2004) e houve alguns registros de reaparecimento de lesões em casos de leishmaniose cutânea difusa na Venezuela (Zerpa *et al.*, 2007). Esse medicamento possui alguns efeitos adversos reversíveis (Sundar *et al.*, 2002; Bhattacharya *et al.*, 2004), mas a maior preocupação refere-se à prolongada meia-vida que pode levar ao aparecimento de resistência (Bryceson, 2001; Sundar & Chatterjee, 2006), como já demonstrado em um estudo de fase IV na Índia (Sundar & Murray, 2005). Em estudos *in vitro* e *in vivo* foram observadas mutações que levam à facilitação da extrusão do medicamento e, conseqüentemente à resistência ao medicamento (Perez-Victoria *et al.*, 2003; More *et al.*, 2003; Dodge *et al.*, 2004; Seifert *et al.*, 2007), e à diminuição do acúmulo nas formas promastigotas (Perez-Victoria *et al.*, 2003<sup>b</sup>). A combinação da miltefosina com outro leishmanicida também pode ser recomendada para o tratamento da leishmaniose visceral (Guerin *et al.*, 2002; Ouellette *et al.*, 2004).

A paromomicina pode ser indicada para administração tópica nos casos de leishmaniose cutânea (Arana *et al.*, 2001), mas em algumas situações se mostrou ineficaz (el-On & Hamburguer, 1987; Soto *et al.*, 1998; Asilian & Davami, 2006). Além disso, foi observado também o aparecimento de resistência a esse medicamento (Teklemariam *et al.*, 1994). Durante o tratamento da leishmaniose visceral, a paromomicina pode ser utilizada em combinação com o estibogluconato de sódio (ES) (Jha *et al.*, 1995; Thakur *et al.*, 2000).

Os medicamentos mais usados para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como o ES (Pentostam<sup>®</sup>) e o antimoniato de meglumina (AM) (Glucantime<sup>®</sup>) (**Figura I.4**), embora casos de resistência sejam comuns em algumas regiões da Índia, como o estado de Bihar (Thakur *et al.*, 2001; Olliaro *et al.*, 2005). No Brasil, o medicamento de primeira escolha é o AM (ou antimoniato de *N*-metilglucamina). Nos casos de leishmaniose visceral recomenda-se a dose de 20 mg de Sb<sup>V</sup>/kg/dia, com aplicação intravenosa ou intramuscular, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias (FUNASA, 2000).



**Figura I.4:** Estruturas químicas dos antimoniais pentavalentes.

(a) Antimoniato de meglumina (Demicheli *et al.*, 1999); (b) Estibogluconato de sódio.

### ***1.3. Antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento das leishmanioses***

#### ***1.3.1 Histórico do uso do antimônio na medicina***

Os registros mais antigos do uso do antimônio remontam ao seu uso pelos assírios (4000 a.c.) e egípcios (2500 a.c.), sendo citado em passagens do Antigo Testamento (McCallum, 1977). O antimônio era usado principalmente sob a forma de trissulfito - denominado stibinito (do Grego *stimmi*; do Latim *stibium*) - como cosmético e na fabricação de unguentos (Thorwald, 1962 *apud* McCallum, 1977). Na Grécia antiga, o conceito de doença e saúde era baseado na teoria dos quatro humores<sup>2</sup>. Esta

<sup>2</sup> Teoria dos quatro humores (inicialmente inspirada nas idéias de Pitágoras e descrita no Corpo Hipocrático) – as doenças seriam causadas pela preponderância de um dos quatro humores sobre os outros. Cada humor era atribuído a uma estação do ano, um elemento, um estado de espírito e sintomas físicos: - Bile amarela → verão, fogo, cólera, calor e secura; - Bile negra → outono, terra, melancolia, frio e secura; Fleuma → inverno, água, fleumático, frio e umidade; - Sangue → primavera, ar, sangrento, quente e úmido (Sigerist, 1960).

teoria preconizava que o processo de cura envolvia o re-equilíbrio dos quatro humores, através, principalmente, da remoção de substâncias do corpo que representassem o humor em desequilíbrio, com a indução de diarreias, vômitos e a realização de sangrias. Nesse contexto, as propriedades eméticas, sudoríficas e purgativas do antimônio foram muito exploradas (McCallum, 1977), o que acabou inspirando, séculos depois, a sua utilização em base puramente empírica e, posteriormente, científica. O interesse especial dos alquimistas pela propriedade desse metal de purificar ouro, também fez com que suas propriedades médicas fossem bastante exploradas.

No século XVI, o médico austríaco Paracelsus tratava as doenças com substâncias específicas, principalmente minerais como o enxofre, o arsênio, o chumbo, o cobre, a prata, o ouro e, o seu favorito, o tártaro emético a base de antimônio, que foi muito utilizado também por seus discípulos (Deichmann *et al.*, 1986). Estima-se que até o ano de 1678 cerca de 106 remédios contivessem antimônio (McCallum, 1999). No século XVII o médico francês Théophraste Renaudot iniciou a distribuição de antimônio para a população pobre de Paris aos sábados e o sucesso de tal prática levou ao aparecimento da primeira grande policlínica na cidade (Reiling, 1906). No século XVIII, membros da Igreja Católica utilizaram o antimônio para o tratamento da varíola, da febre e da sífilis (McCallum, 1977). No início do século XX, o antimônio, sob a forma de sais trivalentes (tártaro emético), tornou-se um importante medicamento para o tratamento da esquistossomose, doença causada por um trematódeo (Bueding & Mansour, 1957). Anos depois, outros compostos trivalentes também passaram a ser utilizados para tratar essa doença: o estibocaptato (Astiban), o estibofen, o antimonilgluconato de sódio (Triostam) e o tiomalato lítio de antimônio (Antiomalina).

Entretanto, somente em 1912, as propriedades leishmanicidas do tártaro emético foram utilizadas por Gaspar Vianna para tratar a leishmaniose mucocutânea (Vianna, 1912). Em 1915, o tártaro emético foi utilizado para o tratamento de leishmanioses viscerais na Itália e na Índia (Shortt, 1945). Diversos efeitos tóxicos começaram a ser notados, principalmente cardíacos que podiam levar o paciente à morte.

Na década de 20 foram introduzidos os antimoniais pentavalentes, mas só entre 1935 e 1945, foram realizados os primeiros estudos clínicos com esses fármacos (Kirk & Sati, 1940; Sati, 1942). O ES foi utilizado em pacientes de leishmaniose visceral na década de 40 no Sudão (Kirk & Sati, 1947) e na China (Tuckaman, 1949). Em ambos os estudos, ele foi administrado por via intravenosa, com maior percentual de cura e diminuição dos efeitos adversos dos que os observados em estudos anteriores,

com outros antimoniais pentavalentes (Napier, 1932 *apud* Tuckman, 1949; Kirk & Sati, 1940). A comprovação da maior eficácia e segurança dos antimoniais pentavalentes levou ao abandono do uso dos antimoniais trivalentes no tratamento das leishmanioses.

Diversos estudos contribuíram para estabelecer o regime de doses e a duração do tratamento, tendo em vista não somente o percentual de cura, mas o aparecimento de efeitos adversos. As recomendações foram publicadas pela Organização Mundial de Saúde em 1984 (WHO, 1984) e podem ser aplicadas tanto ao Pentostam<sup>®</sup> quanto ao Glucantime<sup>®</sup>, uma vez que ambos possuem o mesmo índice terapêutico (Rees *et al.*, 1980; Chulay *et al.*, 1988).

### ***1.3.2 Mecanismo de ação dos antimoniais***

Ainda hoje os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses em diversas regiões do mundo. Embora sejam utilizados há quase seis décadas, o componente biologicamente ativo, a estrutura, a toxicidade seletiva e o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não são bem conhecidos.

A hipótese que o antimônio pentavalente ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ) atua como pró-droga foi primeiramente formulada por Goodwin & Page em 1943. Posteriormente, outros autores também sugeriram que, para exercer a função leishmanicida, o antimonial deveria ser convertido na forma trivalente ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ), a mais tóxica para os estágios amastigota e promastigota do parasita (Mottram & Coombs, 1985; Roberts *et al.*, 1995; Sereno & Lemesre, 1997; Sereno *et al.*, 1998).

Os antimoniais alteram importantes funções biológicas da *Leishmania*. Nas formas amastigotas, o ES provavelmente age através da alteração do metabolismo energético, da inibição da glicólise e da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Berman *et al.*, 1985; Berman *et al.*, 1987). A ação leishmanicida da espécie pentavalente *in vivo* está vinculada a respostas do hospedeiro, liberação de células T e citocinas enquanto sua atividade *in vitro* é limitada (Roberts & Rainey, 1993; Sereno & Lemesre, 1997). Já foi demonstrado que o  $\text{Sb}^{\text{III}}$  pode induzir a apoptose de formas amastigotas, através da fragmentação do seu DNA e exposição de fosfatidilserina na parte externa da membrana plasmática (Sereno *et al.*, 2001, Sudhandiran & Shaha, 2003). Os antimoniais também parecem inibir topoisomerasas da *Leishmania* (Lucumi *et al.*, 1998), formar complexos com biomoléculas de ribose (Demichelli *et al.*, 2002) e interferir com o processo de

translocação de purinas pré-formadas (Carter *et al.*, 2000). A tripanotona é importante para ação dos antimoniais, uma vez que, junto com a tripanotona redutase, é crucial para a sobrevivência do parasita, mantendo o ambiente redutor (Dumas *et al.*, 1997; Tovar *et al.*, 1998). Além disso, esse tiol está envolvido na desintoxicação de íons metálicos através da extrusão dos complexos formados (metal-(TS<sub>2</sub>)) pela proteína transportadora, glicoproteína-P (PGPA) (Fairlamb & Cerami, 1992; Mukhopadhyay *et al.*, 1996). A produção de tripanotona em elevadas quantidades ocorre em parasitas resistentes ao medicamento (Mukhopadhyay *et al.*, 1996).

Casos de resistência ao tratamento com antimoniais vêm sendo relatados nos últimos anos (Carrio & Portus, 2002; Rojas *et al.*, 2006; Hadighi *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2007), principalmente em pacientes infectados pela *Leishmania donovani*, espécie responsável pela forma visceral em algumas regiões da África e Ásia (Sundar, 2000; Sundar *et al.*, 2001; Thakur *et al.*, 2004; Sundar & Chatterjee, 2006). O desenvolvimento de resistência pode ser causado por diversos fatores, tais como: a resposta imune do hospedeiro (Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997), a susceptibilidade ao medicamento e a biologia das espécies de *Leishmania* (Romero *et al.*, 2001; Navin *et al.*, 1992), a expressão de proteínas transportadoras (Mukherjee *et al.*, 2007) e aspectos farmacológicos (al Jaser *et al.*, 1995), tais como, metabolismo, excreção e enzimas de detoxificação.

### ***1.3.3 Farmacocinética e toxicidade dos antimoniais pentavalentes***

As estruturas químicas do AM e do ES ainda não são bem conhecidas, o que dificulta o entendimento dos mecanismos de ação e toxicidade e também o desenvolvimento de formulações mais seguras e eficazes.

Esses medicamentos são preparados a partir da reação do antimônio pentavalente com ácido glucônico (ES) ou com o carboidrato meglumina (AM) (Roberts *et al.*, 1998). O ES é uma mistura complexa de componentes com massa molecular de 100 a 4000 Da cuja composição interfere na eficácia clínica (Berman & Grogl, 1988). Uma estrutura proposta para o AM corresponde a duas moléculas de meglumina ligadas por um átomo de antimônio (Headley *et al.*, 1995). Entretanto, já foram encontrados vários átomos de antimônio ligados a até cinco moléculas do carboidrato, formando aglomerados (Roberts *et al.*, 1998). O grau de polimerização desses complexos pode influenciar fatores cruciais para a atividade leishmanicida, tais

como a farmacocinética do medicamento, a captação pelo sistema reticuloendotelial e a distribuição do antimonial (Roberts *et al.*, 1998).

Os efeitos desejados e tóxicos de um medicamento estão, em geral, associados à concentração no local de ação ou órgão-alvo e esta, por sua vez, depende de aspectos farmacocinéticos, ou seja, absorção, distribuição, biotransformação e excreção. A cinética e a distribuição de um medicamento leishmanicida é crucial para a sua eficácia, uma vez que o parasita pode atingir diversos órgãos, como a medula óssea, fígado, baço, pele ou mucosas.

A absorção dos antimoniais pentavalentes pelo trato gastrointestinal é limitada e as principais vias de administração em humanos são a intramuscular e a intravenosa. Após a entrada no organismo, o  $Sb^V$  se dissocia do carboidrato, pela ação da via endocítica dos lisossomos dos macrófagos (Frézard *et al.*, 1998). Frézard e colaboradores (2001) comprovaram que o  $Sb^V$  pode ser convertido na sua forma trivalente, pela ação da GSH (glutationa reduzida) nos fagolisossomos de macrófagos, dependente da dose, pH e temperatura. Outros tióis presentes nos lisossomos também são capazes de fazer a redução, como a cisteína e a cisteína-glicina (Santos-Ferreira, 2003). O local exato da redução da forma pentavalente para a trivalente ainda não é bem conhecido. Ela poderia ocorrer na presença ou ausência dos macrófagos (Serenio *et al.*, 1998) uma vez que amastigotas axênicas são susceptíveis ao antimônio pentavalente, sugerindo que a redução ocorreu dentro do próprio parasita (Callahan *et al.*, 1996; Ephros *et al.*, 1999; Goyard *et al.*, 2003). Já foi comprovado que a tripanotona ( $T(SH)_2$ ), um tiol específico do parasita, também é capaz de reduzir  $Sb^V$  em  $Sb^{III}$  (Santos-Ferreira *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003).

Outro ponto de controvérsia é o envolvimento de enzimas nesse processo de redução. Ela pode ocorrer de maneira não-enzimática pela glutatona reduzida (Frézard *et al.*, 2001) ou tripanotona e outros tióis tanto nos macrófagos quanto nos parasitas (Santos-Ferreira *et al.*, 2003). Por outro lado, a redução enzimática pode ocorrer também pela ação de redutases dependentes de tióis presentes nas formas amastigotas, que se utilizam da própria glutatona como agente redutor (Denton *et al.*, 2004).

Após a absorção, a distribuição do antimônio é crucial para a sua eficácia, mas também deve ser abordada sob o ponto de vista da segurança toxicológica, principalmente em filhos de mães tratadas com esse medicamento. A passagem transplacentária do antimônio foi estudada em ratos e foi demonstrado que aproximadamente 1/3 do antimônio presente no sangue materno é transferido para a ninhada durante a vida intrauterina (Miranda *et al.*, 2006). Já a passagem para o leite

materno foi evidenciada em um estudo de caso envolvendo uma paciente tratada com ES, mas não foi comprovada por estudos experimentais em hamsters tratados com doses mais elevadas (Berman *et al.*, 1989).

Depois da distribuição pode ocorrer acúmulo do antimônio em alguns tecidos como pele, baço e fígado, como observado em cães e coelhos (Otto & Maren, 1950 *apud* Valladares *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1988<sup>a</sup>) e em hamsters (Berman *et al.*, 1988<sup>b</sup>) tratados com ES. Em cães infectados com leishmaniose visceral e tratados com AM por via intravenosa foi constatado o acúmulo de antimônio no fígado, no baço e na medula óssea (Schettini *et al.*, 2006). Hamsters infectados com *L. garnhami* e tratados com AM, por via intramuscular ou intralesional também apresentaram níveis detectáveis de antimônio no baço, em lesões, nos linfonodos, na bexiga, no coração, no fígado, nos rins e no cérebro (Lugo de Yarbuh *et al.*, 1994). Poon e colaboradores (1998) mostraram que ratos expostos ao antimônio trivalente na água de beber durante 90 dias apresentaram níveis detectáveis de antimônio no baço, no fígado, nos rins, no cérebro e na gordura abdominal.

A velocidade de eliminação é um dos fatores que pode levar ao aumento da dose e da frequência de administração de antimoniais pentavalentes que podem, por sua vez, aumentar o risco de aparecimento de efeitos adversos decorrentes do tratamento. A eliminação do antimônio ocorre por via renal (Rees *et al.*, 1980; Hantson *et al.*, 2000), principalmente por filtração glomerular, sendo que mais de 80% podem ser excretados em até 9 horas, após a administração (Valladares *et al.*, 1996). Em seres humanos foi observada uma fase de excreção rápida e outra lenta, cuja meia-vida pode ser de aproximadamente 50 dias (Miekeley *et al.*, 2002).

A cinética do antimoniato de meglumina pode sofrer alterações de acordo com a faixa etária do indivíduo, o que significa que a exposição sistêmica ao medicamento pode variar com a idade. No estudo de Cruz e colaboradores (2007), pacientes de diferentes faixas etárias receberam, por via intramuscular, a dose de 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg, durante 20 dias. Nas crianças (3 a 6 anos de idade) o *clearance* do antimônio foi maior do que em adultos (20 a 36 anos), resultando, nos primeiros, em uma área sob a curva (AUC) correspondente a 58% da de adultos (0 a 24 horas). Essas diferentes cinéticas podem explicar a baixa resposta de crianças às doses de antimoniais eficazes em adultos (Palácios *et al.*, 2001; Anabwani *et al.*, 1983; Bryceson *et al.*, 1985).

A segunda fase de excreção dos antimoniais é muito lenta e esse fator explica a toxicidade cumulativa (Rees *et al.*, 1980; Chulay *et al.*, 1988). Os efeitos adversos decorrentes da administração de antimoniais pentavalentes, quando usados no



tratamento da leishmaniose visceral, muitas vezes podem ser confundidos com alguns sintomas da própria doença. A alteração de peso corpóreo, seja por letargia, anorexia ou vômitos, pode ocorrer em consequência da leishmaniose, mas também já foi associado ao próprio tratamento com antimoniais (Bryceson *et al.*, 1985; Chulay *et al.*, 1983).

O aumento da concentração residual sanguínea (nadir), seja pela duração do tratamento ou pela dose diária administrada, pode levar ao aparecimento de efeitos cardiotoxicos (Chulay *et al.*, 1988; Sampaio *et al.*, 1997<sup>a</sup>). Efeitos nefrotóxicos foram observados em doses de 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia, durante 30 dias (Veiga *et al.*, 1983) e efeitos hepatotóxicos foram relatados com a dose de 40 mg Sb<sup>V</sup>/kg em pacientes tratados com AM (Sampaio *et al.*, 1997).

Efeitos genotóxicos foram observados com os antimoniais. A indução de micronúcleo, em linfócitos de sangue periférico de pacientes, foi observada durante o tratamento com antimoniato de meglumina por 7 e 15 dias (Hantson *et al.*, 1996). O aumento do estresse oxidativo, resultando em morte celular, foi observado em cardiomiócitos primários expostos *in vitro* ao antimônio trivalente (Tirmenstein *et al.*, 1995).

Efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos e alterações hematológicas foram observados em ratos tratados com AM e ES (AlKhawajah *et al.*, 1992).

O AM foi embriotóxico para ratos a partir da dose de 150 mg Sb<sup>V</sup>/kg, administrada por via subcutânea do dia 1 ao dia 20 de gestação e o NOAEL (nível de dose em que não foram observados efeitos adversos) do estudo foi fixado em 75 mg Sb<sup>V</sup>/kg (Miranda *et al.*, 2006). O AM também foi embriotóxico para ratos em outro estudo, após administração de 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg do dia 6 ao 15 de gestação ou de três doses de 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg apenas no dia 15 de gestação (Paumgarten & Chahoud, 2001). No estudo de Alkhawajah e colaboradores (1996) também foram encontrados alguns efeitos embriofetotóxicos após tratamento via intramuscular do dia 6 ao dia 15 de gestação, com ES ou AM (30, 100 ou 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg).

#### ***1.4. Justificativa do estudo***

As leishmanioses são endêmicas em diversas regiões do mundo e, no Brasil, mais de 20.000 casos, são confirmados anualmente. As medidas de controle da doença envolvem o controle de vetores e reservatórios como os cães. Entretanto, o diagnóstico e o tratamento dos casos ainda é a principal estratégia pública de controle da doença (FUNASA, 2000). As leishmanioses são classificadas como doenças extremamente negligenciadas que, atingindo principalmente países em desenvolvimento, atraem pouco investimento em pesquisa e desenvolvimento do mercado farmacêutico mundial (DNDi, 2007). Assim sendo, os medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses são insuficientes e podem apresentar baixa eficácia e/ou elevada toxicidade.

O tratamento com alguns dos medicamentos que possuem ação leishmanicida, como a anfotericina B e a miltefosina, podem ter elevado custo, ou ainda, levar ao aparecimento de casos de resistência do parasita (Sundar & Chatterjee, 2006; Zerpa *et al.*, 2007)). Dentre as alternativas disponíveis, o medicamento de escolha em diversos países, incluindo o Brasil, são os antimoniais pentavalentes.

A literatura sobre os mecanismos das ações terapêutica e tóxica dos antimoniais pentavalentes é escassa. Vários aspectos da cinética dos antimoniais também são obscuros e mais estudos são necessários para esclarecê-los.

A falta de informações sobre as características cinéticas associadas aos regimes posológicos utilizados, pode ser um fator determinante da resistência do parasita e do aparecimento de efeitos adversos. Alguns estudos propõem a mudança do regime de doses empregadas na clínica com base na constatação que doses menores de antimoniais também podem ser eficazes (Oliveira-Neto *et al.*, 1997<sup>a</sup>).

A passagem do antimônio para o leite materno pode representar risco para o bebê. O único estudo disponível na literatura encontrou quantidades detectáveis de antimônio no leite materno de uma paciente tratada com ES. Entretanto, uma vez que a mãe interrompeu a amamentação quando iniciou o tratamento, não foi possível comprovar até que ponto o antimônio no leite poderia ser transferido para o bebê (Berman *et al.*, 1989).

Os estudos cinéticos fornecem informações importantes tais como o perfil de distribuição tecidual, a ligação a proteínas plasmáticas, e a velocidade de eliminação. Além de conhecer melhor a cinética do antimônio é importante também investigar os seus efeitos sobre enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos.

Outro aspecto importante para a avaliação da segurança do AM é o seu efeito na expressão e atividade das enzimas do complexo citocromo P450 (CYP). Essa superfamília de enzimas que catalisam a monooxidação de substratos é a principal responsável pelas reações de fase I de biotransformação de xenobióticos. Assim sendo a alteração da atividade das enzimas citocromo P450 pode levar a modulação da cinética de diversos medicamentos, poluentes ambientais e outros xenobióticos.

### ***1.5. Objetivos do estudo***

O objetivo maior deste trabalho foi contribuir para o conhecimento da cinética dos antimoniais pentavalentes em primatas não humanos e roedores e investigar se o tratamento com esses fármacos leishmanicidas altera a atividade e expressão de isoformas de citocromo P450 hepáticas em ratos. O trabalho compreende três estudos cujos objetivos específicos foram:

- Capítulo II: Avaliar o comportamento farmacocinético do AM em macacos Rhesus infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com 5 mg Sb<sup>V</sup>/kg ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg durante 21 dias consecutivos por via intramuscular.
- Capítulo III: Verificar a passagem do antimônio para o leite materno e para os filhotes de ratas tratadas durante o período da lactação com AM.
- Capítulo IV: Investigar as alterações de atividade e expressão das principais enzimas da fase I de biotransformação de xenobióticos em ratos tratados durante 21 dias com diferentes doses de AM.

**CAPÍTULO II – Estudo da cinética do antimoniato de meglumina (AM) em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*)**

## II.1 Introdução

Nas primeiras décadas da utilização dos antimoniais pentavalentes para o tratamento das leishmanioses, os regimes terapêuticos eram determinados empiricamente sem fundamentação em estudos farmacocinéticos. Em estudos clínicos realizados entre 1935 e 1945 (Kirk & Sati, 1947) foi utilizada, para o tratamento de leishmaniose visceral, a dose de 10 mg Sb/kg/dia, durante 6 dias. Esta dose foi escolhida a partir das doses de compostos trivalentes usadas na prática clínica. Na década de 1960, a mesma dose passou a ser administrada por um período de 30 dias (Wijers, 1971) e, a partir da década de 1980, empregou-se a dose de 20 mg Sb/kg, durante 20 a 28 dias, respeitando o limite máximo de 850 mg Sb<sup>V</sup>/dia (Anabwani *et al.*, 1983; WHO, 1984). As doses de antimoniais pentavalentes foram sendo ajustadas de acordo com o percentual de cura, as manifestações clínicas e os efeitos tóxicos. Recentemente, após a identificação de casos de resistência, constatou-se que a região em que a doença é endêmica e as características biológicas do parasita, e do hospedeiro, também são importantes na seleção de regimes terapêuticos mais eficazes e seguros (Romero *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2007).

Embora o regime de doses pelo antimônio recomendado pela OMS (20 mg/kg/dia durante 3 a 4 semanas), seja eficaz na grande maioria dos casos, existe o risco de efeitos adversos. O tratamento com doses baixas de antimonio de meglumina, que já se mostrou eficaz em alguns casos, pode ser uma alternativa útil para diminuir a ocorrência de efeitos adversos.

Pacientes infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* atendidos em um hospital de referência, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, foram tratados com doses entre 3,8 e 22 mg Sb<sup>V</sup>/kg, durante 30 dias e apresentaram elevado percentual de cura sem recidivas, mesmo após 5 anos de acompanhamento (Oliveira-Neto *et al.*, 1996). Outros pacientes provenientes do mesmo hospital, tratados com doses de 5 ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg durante 30 dias, também apresentaram elevado percentual de cura com ambas as doses quando acompanhados por 7 anos (Oliveira-Neto *et al.*, 1997<sup>b</sup>). O tratamento de pacientes em estágios mais avançados da doença, também foi eficaz e, como esperado, causou menos efeitos adversos (Oliveira-Neto, 2000). O estudo de caso de Oliveira-Neto & Mattos (2006) sugeriu que o tratamento com baixas doses de antimonial pode ser eficaz mesmo em pacientes que não responderam ao tratamento com o regime padrão com doses altas.

Em estudos experimentais com macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com a dose baixa ou a dose padrão de antimoniato de meglumina (5 ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg durante 28 dias) apresentaram respostas semelhantes (Teva *et al.*, 2005) às que haviam sido relatadas para pacientes tratados com as mesmas doses (Oliveira-Neto *et al.*, 1997).

Os estudos de Teva e colaboradores (2003 e 2005), com a leishmaniose cutânea, e o de Porrozzì e colaboradores (2006), com a leishmaniose visceral, demonstraram que as manifestações clínicas observadas em macacos Rhesus foram muito similares às observadas em seres humanos. Assim, esse primata parece ser um modelo experimental promissor para a pesquisa e desenvolvimento de intervenções preventivas e terapêuticas para as leishmanioses.

O estudo comparativo do comportamento cinético, após o tratamento com doses baixas e altas de antimoniais pentavalentes, pode fornecer informações cruciais para a implementação de regimes terapêuticos mais eficazes e seguros. Nas principais bases de dados nacionais e internacionais consultadas não foram encontrados estudos em primatas não-humanos focalizando a cinética de antimoniais pentavalentes.

## ***II.2 Objetivos***

### ***II.2.1 Objetivo geral***

Avaliar a eliminação e a distribuição do antimoniato de meglumina em macacos Rhesus infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com 5 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia durante 21 dias consecutivos por via intramuscular.

### ***II.2.2 Objetivos específicos***

- Quantificar antimônio total em sangue durante e após o tratamento dos macacos com 5 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de AM durante 21 dias.
- Determinar a concentração residual de antimônio resultante do tratamento em tecidos incluindo: adrenais, baço, bexiga, bulbo, cerebelo, cérebro, cólon, coração, estômago, fígado, gânglios axilares e inguinais, pâncreas, pulmões, rins, timo, tireóide e vesícula, músculo, osso, dente, unha e pêlos.



## ***II.3 Materiais e métodos***

### ***II.3.1 Animais***

Foram utilizados 12 macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) adultos fêmeas (n=11) e macho (n=1) do Serviço de Primatologia da FIOCRUZ, pesando de 4,95 a 8,62 kg (Tabela II.1). Os macacos foram alojados individualmente em gaiolas deslizantes (*squeeze-back*), alimentados diariamente com ração comercial para primatas, frutas, vegetais e água fornecida *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram revistos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ). Os animais foram monitorados diariamente por especialistas em primatas não-humanos e avaliados por um veterinário.

**Tabela II.1:** Peso corporal e sexo dos macacos (Rhesus) utilizados no estudo farmacocinético do AM e infectados com *L. (V.) braziliensis*.

| <b>Identificação</b> | <b>Sexo</b> | <b>Peso início<br/>tratamento<br/>(kg)</b> | <b>Peso fim<br/>tratamento<br/>(kg)</b> | <b>Dose AM</b>                |
|----------------------|-------------|--|---|-------------------------------|
| <b>S62</b>           | Fêmea       | 7,30                                       | 6,95                                    | 5 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia  |
| <b>140</b>           | Fêmea       | 8,40                                       | 8,62                                    | 5 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia  |
| <b>142</b>           | Fêmea       | 7,55                                       | 6,60                                    | 5 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia  |
| <b>O6</b>            | Fêmea       | 6,40                                       | 5,40                                    | 5 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia  |
| <b>T32</b>           | Fêmea       | 5,15                                       | 4,95                                    | 5 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia  |
| <b>U48</b>           | Fêmea       | 5,45                                       | 5,45                                    | 5 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia  |
| <b>M2</b>            | Fêmea       | 7,60                                       | 7,20                                    | 20 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia |
| <b>U12</b>           | Fêmea       | 5,25                                       | 5,50                                    | 20 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia |
| <b>L30</b>           | Fêmea       | 5,95                                       | 6,25                                    | 20 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia |
| <b>O34</b>           | Fêmea       | 6,15                                       | 5,77                                    | 20 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia |
| <b>X53</b>           | Macho       | 4,25                                       | 5,00                                    | 20 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia |
| <b>U46</b>           | Fêmea       | 5,45                                       | 5,30                                    | 20 mg Sb <sup>V</sup> /kg/dia |

### ***II.3.2 Infecção com Leishmania braziliensis***

Os animais foram infectados com formas amastigotas ( $2 \times 10^7$ ) de *Leishmania (V.) braziliensis*. A inoculação foi realizada por via intradérmica na região supraocular. As lesões foram identificadas visualmente.

### ***II.3.3 Tratamento com antimoniato de meglumina (AM)***

Os macacos foram anestesiados com 10 a 20 mg/kg de peso corpóreo de cloridrato de quetamina (Vetalar®) e tratados com 5 (n=6) ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg (n=6) (Glucantime®) durante 21 dias consecutivos. A anestesia e o tratamento foram realizados por via intramuscular.

### ***II.3.4 Coleta das amostras para quantificação de antimônio***

As amostras de pêlo para dosagem de antimônio foram coletadas do dorso do animal um dia antes do tratamento e a partir de então, a cada 14 dias até o fim do estudo. Os pêlos foram coletados de região cuidadosamente escolhida a fim de evitar possíveis contaminações externas provenientes do tratamento.

Durante os 21 dias de tratamento, a coleta de sangue foi realizada após a anestesia do animal, mas sempre antes da administração do medicamento. O sangue foi coletado em tubos *Vacutainer*® heparinizados. A primeira amostra foi coletada um dia antes do início do tratamento, designado como dia 0 (zero). No primeiro dia de tratamento (dia 1) foram coletadas amostras de sangue 2, 6, 12 e 24 horas após a primeira dose. As demais coletas foram realizadas antes da injeção nos dias 2, 5, 9, 12, 16, 19, 22, 23, 26, 30, 33, 37, 40, 44, 47, 51, 54, 58, 61, 68 e 75. Os intervalos entre as coletas (sempre às segundas e sextas-feiras) foram determinados obedecendo ao tempo mínimo para recuperação e respeitando os dias e horários da manutenção das gaiolas, a fim de minimizar o estresse imposto aos animais.

Imediatamente após a coleta, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e o sedimento (papa de hemácias) e o sobrenadante (plasma) aliquotados

separadamente em tubos de polipropileno devidamente identificados e armazenados a -20°C até o momento da análise. As massas do plasma e da papa de hemácias foram determinadas.

### ***II.3.5 Necrópsia***

As necrópsias ocorreram nos dias: 74, 75, 78 e 79 após o início do tratamento. Os animais foram primeiramente anestesiados com cloridrato de quetamina 10% e eutanaziados com tiopental sódico. Os órgãos removidos foram: adrenais, baço, bexiga, bulbo, cerebelo, cérebro, cólon, coração, estômago, fígado, gânglios axilares e inguinais, pâncreas, pulmões, rins, timo, tireóide e vesícula. O cerebelo foi dividido em cerebelo, ponte e mesencéfalo, e o cérebro em lobos frontal, occipital, parietal, temporal. Foram retiradas amostras de dente, medula óssea, músculo (quadríceps), osso (costela), pele, pelo e unhas. Após a pesagem dos órgãos, foram retirados, pesados e identificados fragmentos, que foram posteriormente armazenados a -20°C até o momento da quantificação de antimônio.

### ***II.3.6 Lavagem e digestão das amostras de pêlos***

Essa etapa do estudo foi realizada no Laboratório de ICP-MS da PUC-Rio, coordenado pelo Prof. Dr. Norbert Miekeley. A metodologia de lavagem e abertura de pêlos é a mesma que o laboratório de ICP-MS da PUC-Rio vem empregando rotineiramente.

As amostras de pelo foram submetidas a lavagens sucessivas em banho ultrassônico com solução de acetona em água deionizada. As amostras foram colocadas em estufa a 60°C para secagem. A amostra (250 mg) foi digerida com 2,5 mL de HNO<sub>3</sub> subdestilado (ácido nítrico) durante 12 horas à temperatura ambiente. As amostras foram então colocadas em bloco digestor a 80°C por 2 horas. Posteriormente, foi adicionado 1,0 ml de peróxido de hidrogênio supra puro (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e os tubos foram colocados em bloco de digestão a 70 °C por 15 minutos. Após resfriamento, as amostras foram então diluídas com água deionizada até completar o volume de 25 mL.

### ***II.3.7 Processo de abertura (digestão ácida) de amostra de biológicas***

O volume de 2,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado foi adicionado aos tubos contendo massa conhecida da amostra (cerca de 1g). Os tubos foram colocados em chapa de aquecimento à aproximadamente 95°C por 16 horas. Após a visualização da digestão e resfriamento das amostras a temperatura ambiente, diluindo a amostra para volume final de 10 mL.

As amostras coletadas antes do início da aplicação do medicamento foram diluídas 10 vezes. Neste caso também foi adicionado o padrão interno na diluição final, para posterior determinação de Sb total por ICP-MS pelo modo quantitativo com calibração externa. Para todas as outras amostras biológicas, as diluições foram feitas conforme a concentração esperada do analito (*e. g.* 1:100, 1:1000). O fator de diluição empregado no modo quantitativo do ICP-MS foi corrigido pela massa da amostra biológica.

Os órgãos foram liofilizados em liofilizador (Liobrás L101 e bomba de vácuo Dosivac DVR140) e distribuídos em alíquotas de aproximadamente 250 mg. Após a adição de 5 mL de HNO<sub>3</sub>, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 12 horas. Os tubos foram colocados em bloco digestor à 80°C por 3 horas. Após resfriamento, adicionou-se 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, posteriormente, as amostras foram submetidas a novo aquecimento por 10 minutos. Água deionizada foi adicionada até completar o volume de 20 mL.

### ***II.3.8 Quantificação de antimônio total***

As amostras de plasma e *pool* de hemácias foram diluídas 10, 100 ou 1000 vezes e as de órgãos, 400 ou 800 vezes. Após a diluição o padrão interno (<sup>115</sup>In) foi adicionado.

A quantificação de antimônio total (Sb<sup>121</sup> e Sb<sup>123</sup>) foi realizada por ICP-MS em aparelho ELAN 5000 A (Perkin-Elmer, Sciex, USA) equipado com nebulizador Meinhard e uma câmara de nebulização ciclônica (ambos da Glass Expansion, AU).

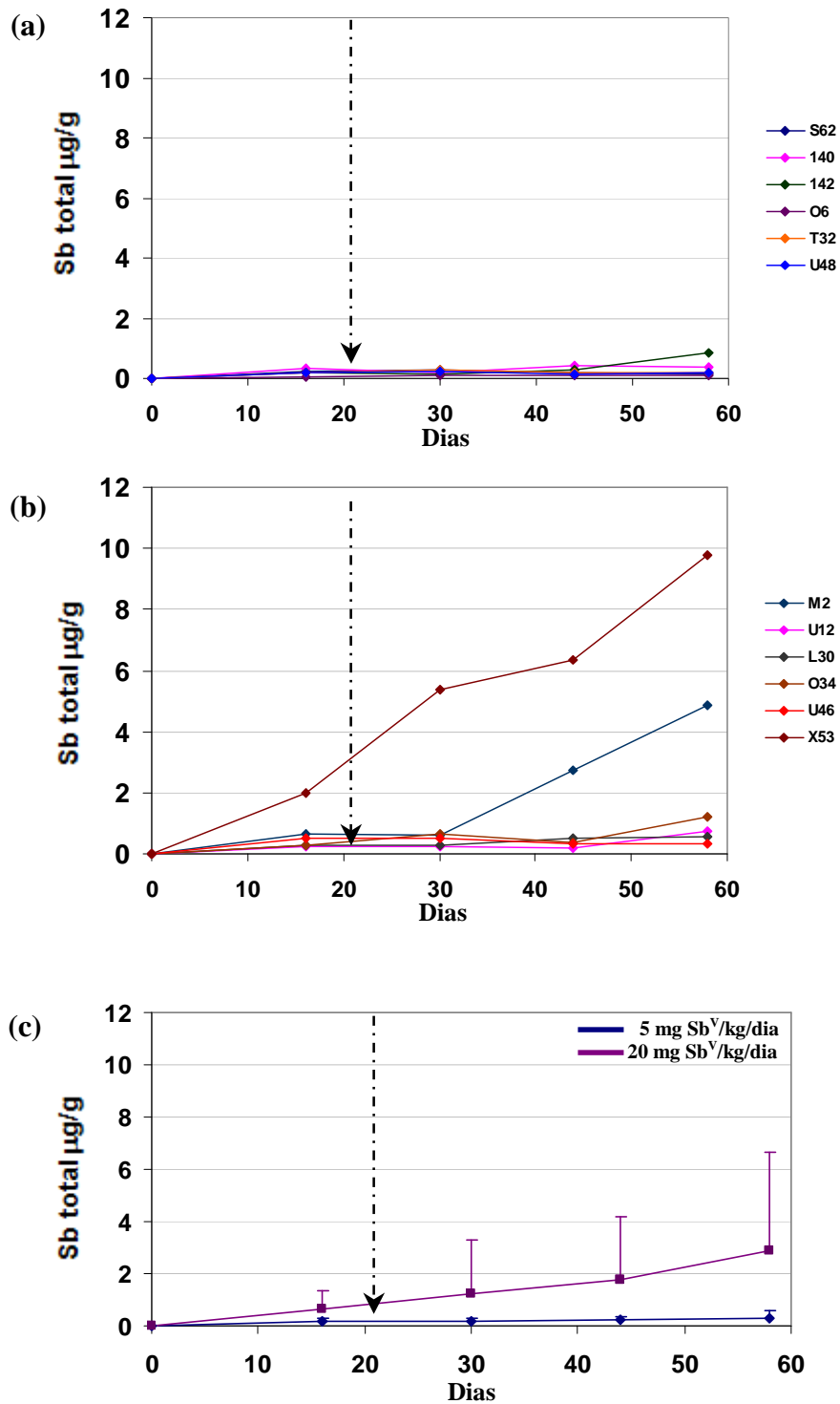
Os valores foram corrigidos pelo fator de diluição e pela massa da amostra biológica determinada no momento da coleta ou do peso seco, após o processo de liofilização, no caso dos órgãos.

## ***II.4 Resultados***

O tratamento com a menor dose de AM, 5 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia durante 20 dias, não foi eficaz em três animais: S62, T32 e U48. No momento da necropsia, *i.e.*, cerca de 60 dias após o fim do tratamento, foi identificado visualmente o reaparecimento das lesões supraoculares.

### ***II.4.1 Concentração de antimônio em pêlos***

A **Figura II.1** mostra os resultados da concentração de antimônio total (média±DP) em pêlos de Rhesus tratados com 5 ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg/ dia durante 20 dias. Os valores médios mostram um aumento das concentrações de antimônio total mesmo após o fim do tratamento. Os elevados desvios-padrões encontrados devem-se a limitação da quantidade de pêlos durante a coleta.



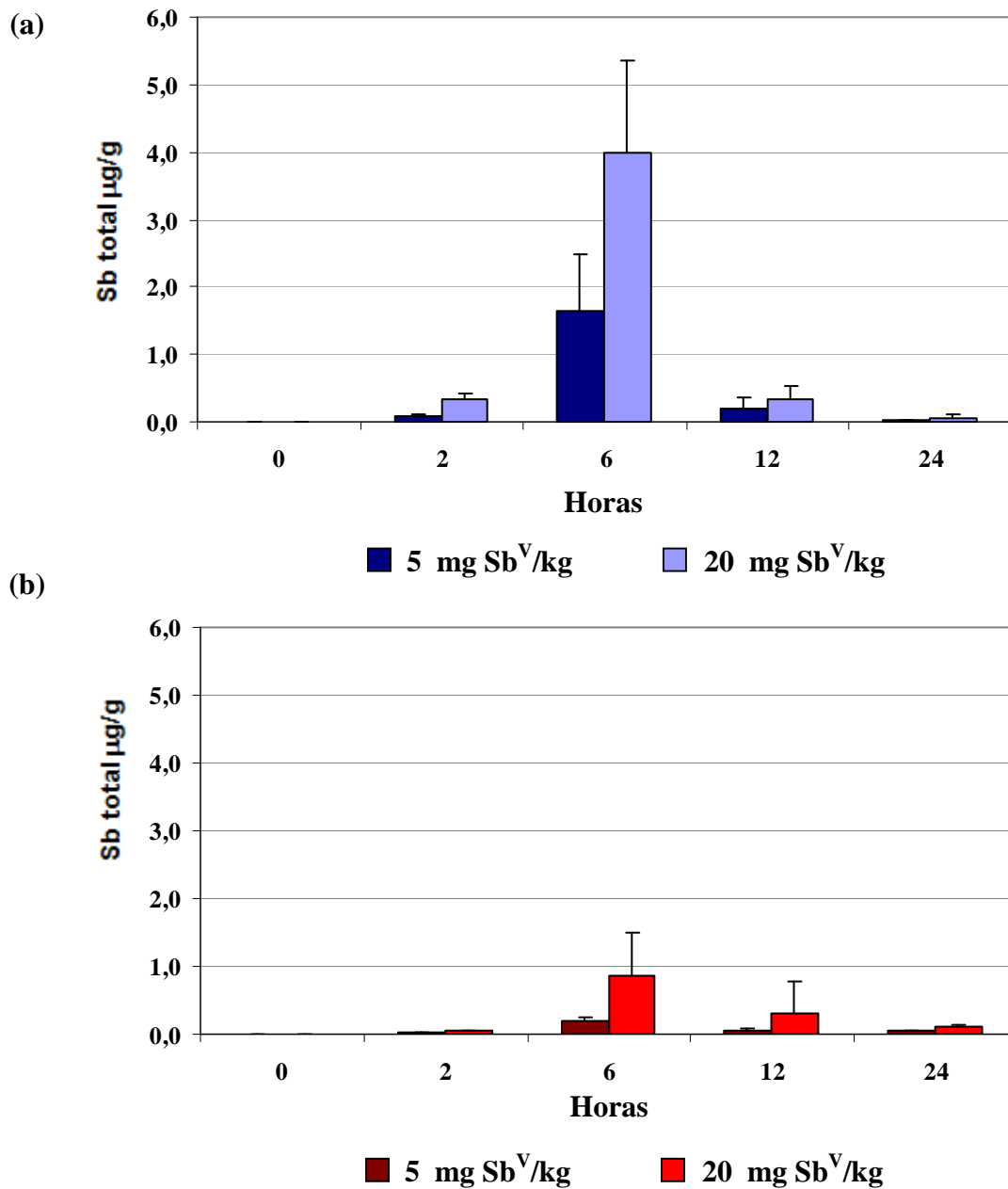
**Figura II.1:** Concentração de antimônio total nos pêlos de cada um dos macacos Rhesus tratados com 5 (a) ou 20 (b) mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia durante 21 dias por via intramuscular. Médias±DP dos dois grupos de tratamento (c). A seta indica o término do tratamento.

#### ***II.4.2 Concentração de antimônio em plasma e pool de hemácias***

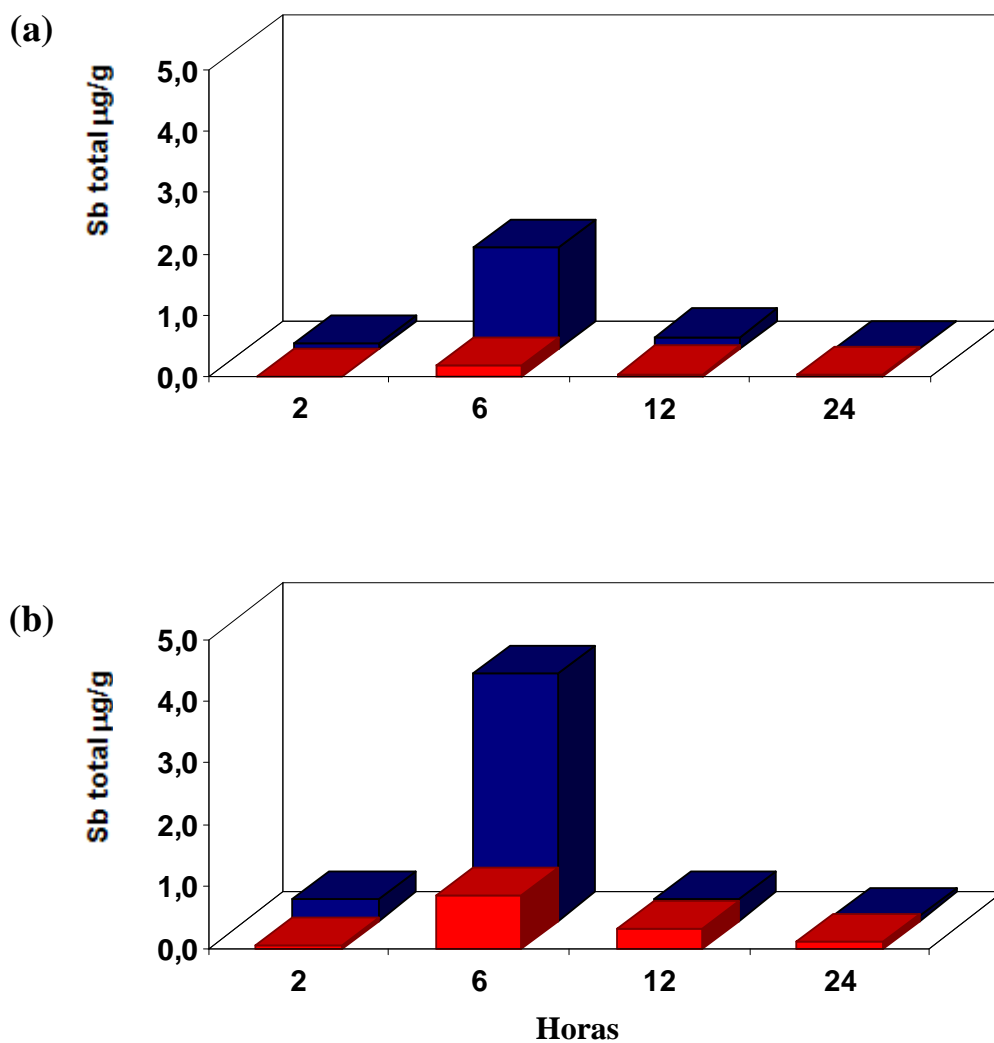
A partir da comparação dos níveis de antimônio total em plasma com os níveis em *pool* de hemácias observou-se que a concentração de antimônio é maior no plasma nas primeiras horas após a primeira injeção de AM (**Figura II.2 e Figura II.3**). Os valores brutos dessas análises são mostrados nos **Anexos I e II**.

Nas amostras coletadas durante e após o período de tratamento, níveis mais elevados de antimônio residual total foram detectados na papa de hemácias em ambas as doses estudadas (**Figuras II.4 e Figura II.5**). Na **Figura II.6** é possível observar que, ao contrário dos valores encontrados logo após a primeira injeção com AM, os maiores níveis de antimônio foram encontrados nas hemácias. Os valores brutos dessas análises são mostrados nos **Anexos III a VI**.

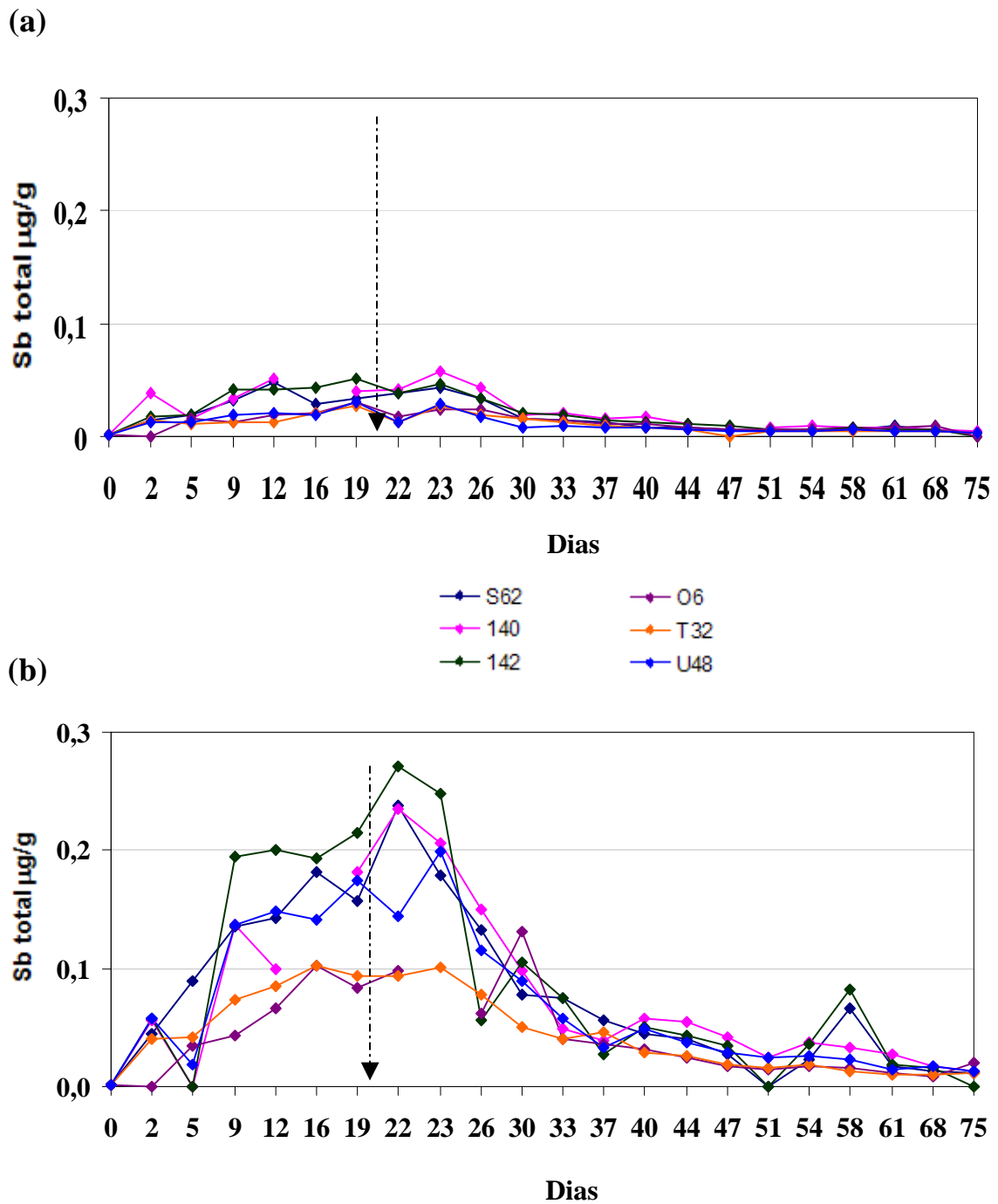




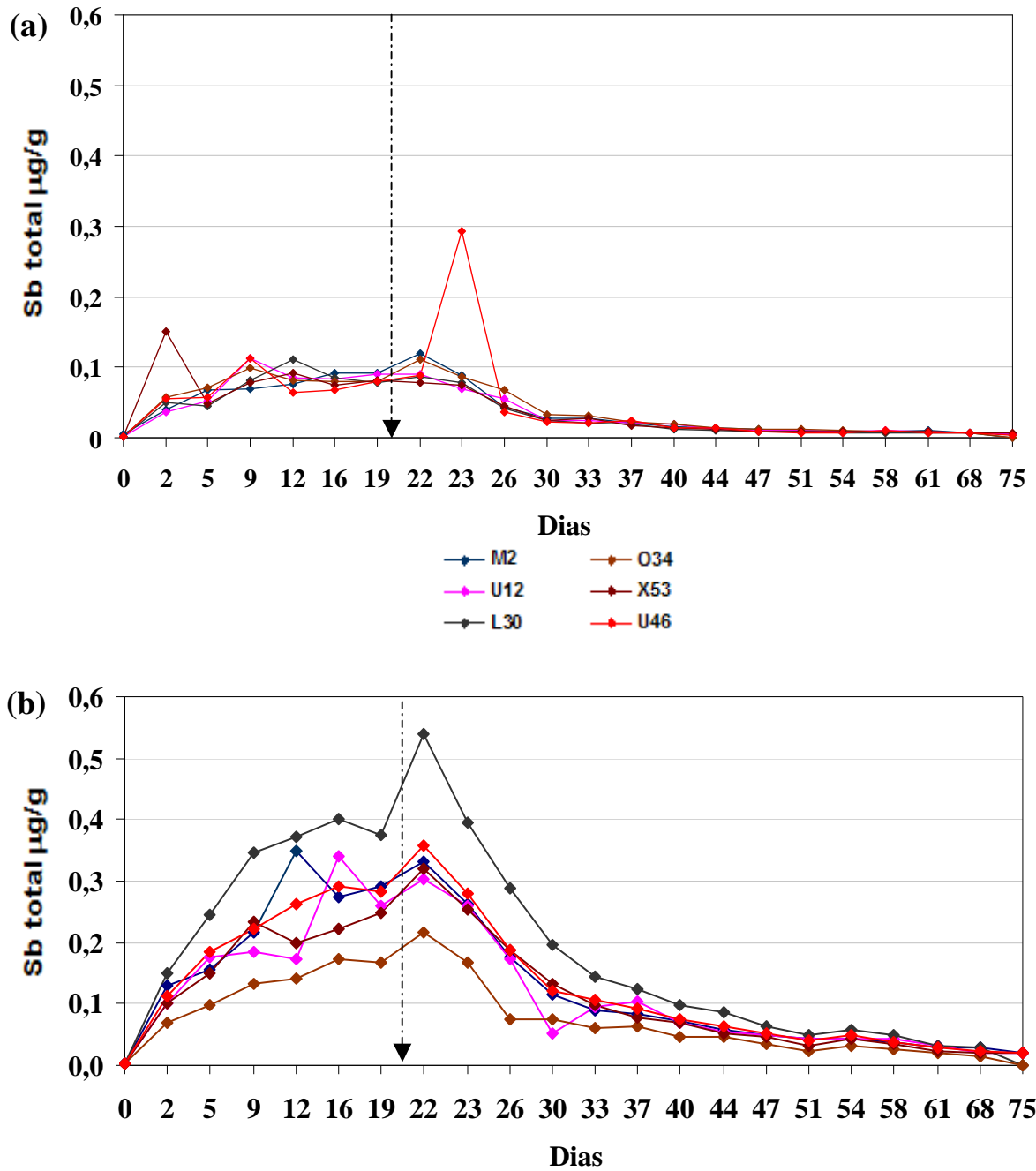
**Figura II.2:** Níveis de antimônio total ( $\mu\text{g/g}$ ) (média $\pm$ DP) em plasma (a) e papa de hemácias (b) em macacos Rhesus tratados com AM nas doses de 5 ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg horas após a primeira injeção por via intramuscular.



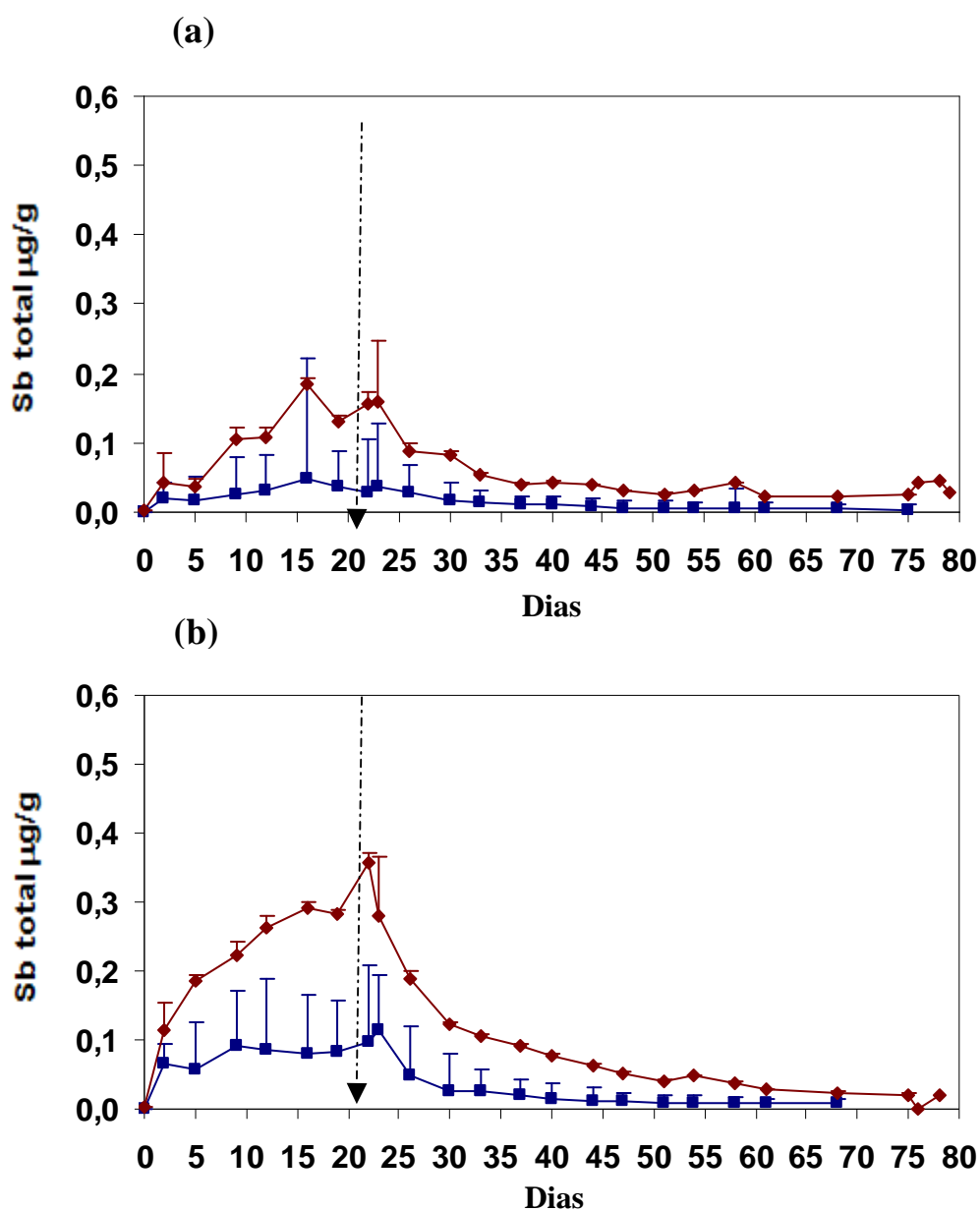
**Figura II.3:** Concentração de antimônio total ( $\mu\text{g/g}$ ) (média) em plasma (azul) e papa de hemácias (vermelho) de macacos Rhesus tratados com AM nas doses de 5 (a) e 20 (b)  $\text{mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$ , 2, 6, 12 e 24 horas após a primeira injeção por via intramuscular.



**Figura II.4:** Níveis residuais de antimônio total ( $\mu\text{g/g}$ ) (média $\pm$ DP) em plasma (a) e em papa de hemácias (b) de macacos Rhesus tratados com 5 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}$ /kg durante e após o tratamento por via intramuscular (valores individuais). A seta indica o término do tratamento.



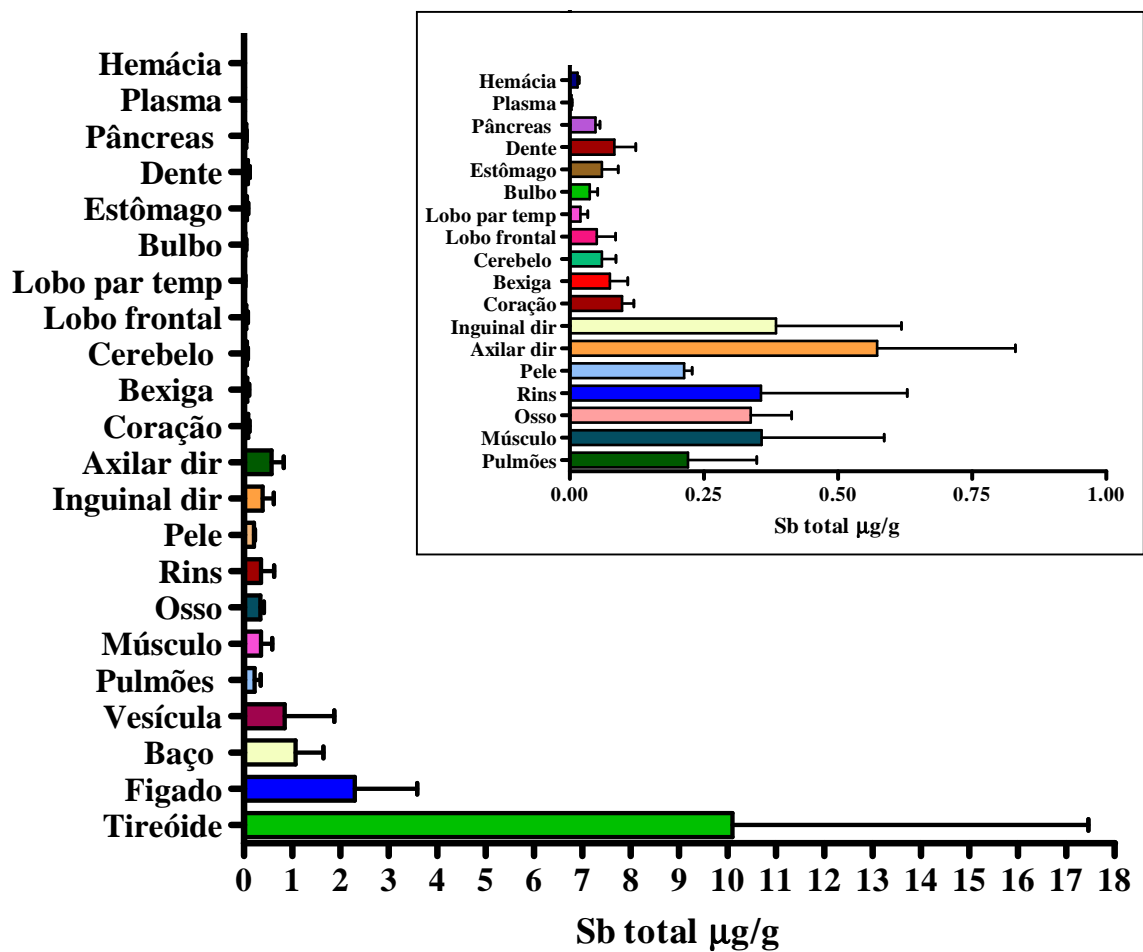
**Figura II.5:** Níveis residuais de antimônio total ( $\mu\text{g/g}$ ) (média $\pm$ DP) em plasma (a) e em papa de hemácias (b) de macacos Rhesus tratados com 20 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}$ /kg durante e após o tratamento por via intramuscular (valores individuais). A seta indica o término do tratamento.



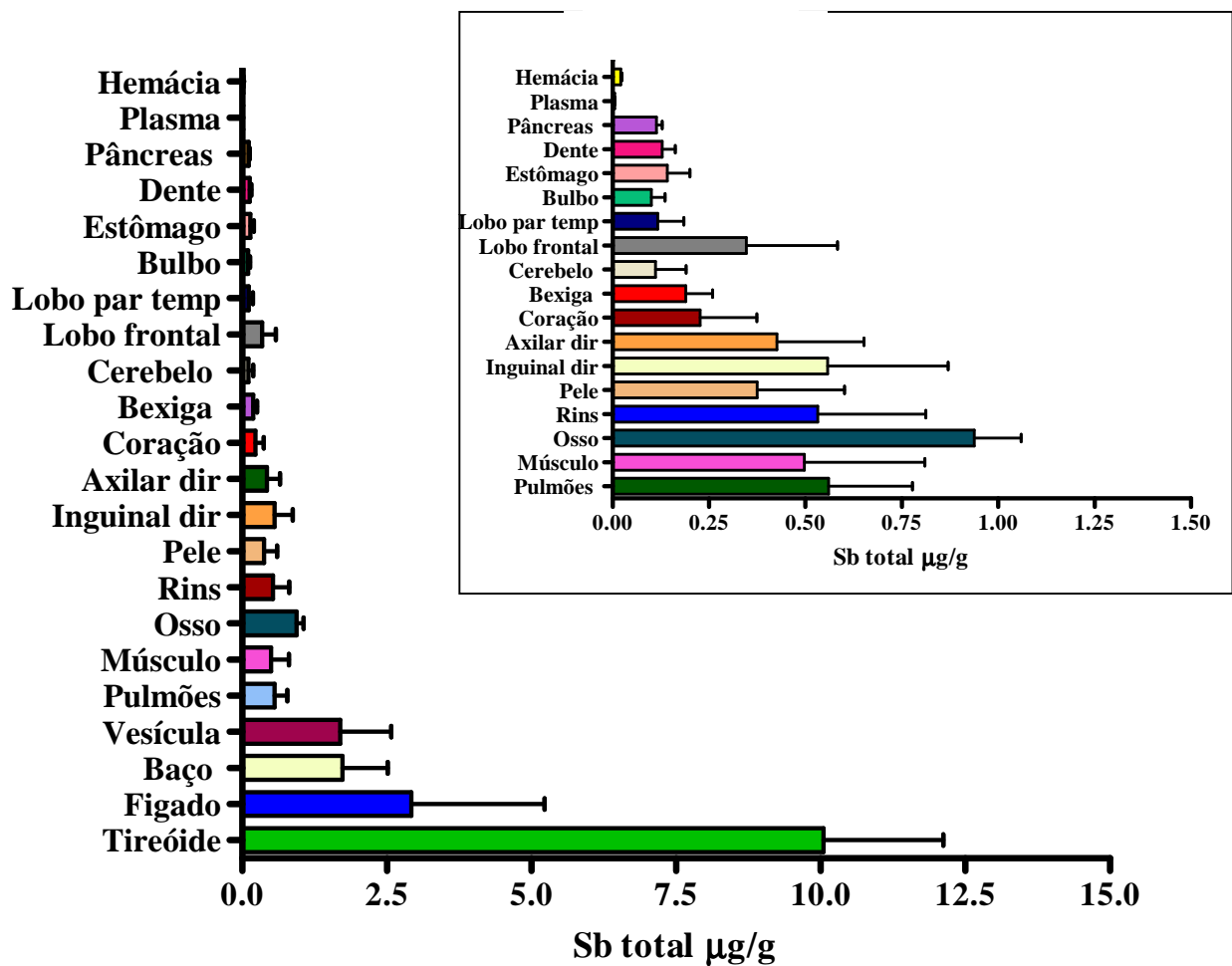
**Figura II.6:** Concentração de antimônio total ( $\mu\text{g/g}$ ) (média $\pm$ DP) em plasma (azul) e papa de hemácias (vermelho) de macacos Rhesus tratados com AM nas doses de 5 (a) e 20 (b) mg Sb<sup>V</sup>/kg durante e após o tratamento por via intramuscular. A seta indica o término do tratamento.

### *II.4.3 Concentração de antimônio em órgãos de macacos*

Nas amostras de todos os órgãos (liofilizados) de macacos Rhesus, tratados com AM, foram encontrados níveis quantificáveis de antimônio. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,005 e 0,010 µg/g, respectivamente. Os níveis mais elevados de antimônio foram encontrados na tireóide, no fígado, no baço e na vesícula, em níveis aproximadamente 500, 300 e 270 vezes maiores que os níveis encontrados no sangue seis dias antes da coleta de órgãos (**Figuras II.7 e II.8**). A análise de antimônio no fígado de animais não tratados mostrou níveis extremamente baixos de antimônio:  $0,0032 \pm 0,0005$  µg/g (média±DP).



**Figura II.7** Concentração de antimônio total nos órgãos removidos de macacos Rhesus tratados (n=3) com AM na dose de 5 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia, 60 dias após o fim do tratamento. Em destaque os órgãos que apresentaram níveis menores de antimônio. Valores: Média±DP.



**Figura II.8** Concentração de antimônio total nos órgãos removidos de macacos Rhesus tratados (n=3) com AM na dose de 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia, 60 dias após o fim do tratamento. Em destaque os órgãos que apresentaram níveis menores de antimônio. Valores: Média±DP.



## II.5 Discussão

A proximidade filogenética com seres humanos (Kennedy *et al.*, 1997) e a similaridade de resposta imunológica levaram à escolha do macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (Giavedoni, 2005; Pahar *et al.*, 2003) como um modelo para a pesquisa e desenvolvimento de vacinas e medicamentos para a leishmaniose humana. Alguns estudos demonstraram que a evolução clínica da leishmaniose cutânea (Teva *et al.*, 2005) e visceral (Porrozzi *et al.*, 2006) em macacos Rhesus é muito semelhante à descrita em seres humanos. Macacos Rhesus também responderam ao tratamento com antimoniato de meglumina tal como os seres humanos (Teva *et al.*, 2005).

Neste estudo dois grupos de macacos Rhesus (n=6 por grupo) foram tratados por via intramuscular com duas doses de antimoniato de meglumina, *i.e.* 5 ou 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg de peso corpóreo/ durante 21 dias. A maior dose é a preconizada pela OMS e utilizada rotineiramente na clínica. A menor dose (5 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) foi eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea em alguns estudos com seres humanos (Oliveira-Neto *et al.*, 1997; Oliveira-Neto, 2000; Oliveira-Neto & Mattos, 2006).

O antimônio foi quantificado em amostras de pêlo antes do tratamento e, após o início deste, a cada 14 dias. A **Figura II.1** mostra que, em ambos os regimes de dose, houve um aumento dos níveis médios de antimônio no pêlo após o fim do tratamento. É importante destacar que, embora as concentrações de antimônio total em pêlos de macacos tenham apresentado alta variabilidade em torno da média, os resultados indicam acúmulo de antimônio relacionado à dose. A variabilidade pode ser explicada, em parte, pela lentidão do crescimento dos pêlos de macacos fazendo com que, nem sempre, as amostras pudessem ser retiradas da mesma região. Como já havia sido observado em humanos, as concentrações de antimônio nos pêlos podem ser indicadores da exposição ao metal (Dórea *et al.*, 1987; Miekeley *et al.*, 2002). No estudo de Miekeley e colaboradores (2002) o nível máximo de antimônio em cabelos foi observado 30 dias após o fim do tratamento de seres humanos com 5 mg Sb<sup>V</sup>/kg de antimoniato de meglumina durante 60 dias. Neste estudo, os níveis de antimônio nos pêlos continuaram elevados 40 dias depois do fim do tratamento e ainda foram detectados até aproximadamente 200 dias após o fim do tratamento.

Amostras de sangue foram coletadas 2, 6, 12 e 24 horas após a primeira injeção de antimoniato de meglumina. A maior concentração de antimônio no plasma e em papa de hemácias foi observada 6 horas após a injeção intramuscular. A

concentração de antimônio no plasma, 6 horas depois da primeira injeção foi  $1,655 \pm 0,838 \mu\text{g/g}$  (média $\pm$ DP) nos animais que receberam a dose de  $5 \text{ mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$ . A concentração de antimônio na papa de hemácia dos mesmos animais, no mesmo tempo de coleta foi  $0,194 \pm 0,065 \mu\text{g/g}$ . Nos animais tratados com a dose de  $20 \text{ mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$ , as concentrações de antimônio no plasma e na hemácia foram, respectivamente,  $4,002 \pm 1,355 \mu\text{g/g}$  e  $0,853 \pm 0,642 \mu\text{g/g}$ .

A concentração máxima de antimônio total no sangue de seres humanos, tratados com ES ou com AM por via intramuscular, foi alcançada aproximadamente 2 horas após o tratamento (Rees *et al.*, 1980; Al Jaser *et al.*, 1995; Chulay *et al.*, 1988). A **Tabela II.2** relaciona os níveis máximos de antimônio em diferentes amostras obtidas em estudos realizados com animais.

Neste estudo com macacos Rhesus, a concentração máxima de antimônio foi obtida 6 horas após o tratamento, divergindo do que tem sido relatado na literatura com outras espécies de animais e com seres humanos. A coleta de sangue dos macacos ocorreu 2, 6, 12 e 24 horas após o tratamento e é possível que a concentração máxima tenha sido alcançada entre 2 e 6 horas. Sendo assim, o valor observado com 6 horas poderia estar na fase de queda da concentração.

**Tabela II.2:** Tempo para concentração máxima de antimônio (T<sub>máx</sub>) em animais e seres humanos tratados com antimoniato de meglumina (AM) ou estibogluconato de sódio (ES), por diferentes vias de administração.

| <b>Espécie (infecção)</b>         | <b>Matriz biológica</b> | <b>Tempo para concentração máxima (horas)</b> | <b>Medicamento</b> | <b>Referência</b>               |
|-----------------------------------|-------------------------|---|--------------------|---------------------------------|
| Cães (NI)                         | plasma                  | 1,3 h (i.m.)                                  | AM                 | Valladares <i>et al.</i> , 1996 |
| Cães (NI)                         | soro                    | 1,5 h (i.m.)<br>3,5 h (s. c.)                 | AM                 | Tassi <i>et al.</i> , 1994      |
| Cães                              | soro                    | 3 h (s.c)                                     | ES                 | Belloli <i>et al.</i> , 1995    |
| Cães ( <i>L. infantum</i> )       | plasma                  | 1,7 h (s.c.)                                  | AM                 | Valladares <i>et al.</i> , 1998 |
| Hamsters ( <i>L.donovani</i> )    | soro                    | 1 h (i.m.)                                    | ES                 | Berman <i>et al.</i> , 1988     |
| Ratos (NI)                        | sangue total            | 1 h (s.c.)                                    | AM                 | Miranda <i>et al.</i> , 2003    |
| Humanos (leishmaniose cutânea)    | sangue total            | 1,3 h (i.m)                                   | ES                 | Al Jaser <i>et al.</i> , 1995   |
| Humanos (leishmaniose visceral)   | sangue total            | 2 h (i.m.)                                    | ES e AM            | Chulay <i>et al.</i> , 1988     |
| Humanos (leishmaniose visceral)   | soro                    | 2 h (i.m.)                                    | ES                 | Rees <i>et al.</i> , 1980       |
| Rhesus ( <i>L. braziliensis</i> ) | plasma e hemácia        | 6 h (i.m.)                                    | AM                 | Presente estudo                 |

NI = animal sadio, não infectado; i.m. = intramuscular; s.c. subcutânea; AM= antimoniato de meglumina; ES=estibogluconato de sódio

Nos macacos tratados com AM a concentração de antimônio foi maior no plasma do que na papa de hemácias nas primeiras horas após a primeira injeção intramuscular. Durante a fase lenta de eliminação (Sb residual) essa relação foi invertida e as concentrações foram maiores na papa de hemácias do que no plasma, como mostrado na **Figura II.4**. No dia 22, *i.e.* 24 horas após a última injeção, a concentração de antimônio nas amostras de plasma do grupo tratado com a maior dose foi de  $0,0957 \pm 0,016 \mu\text{g/g}$ . Na papa de hemácias dos mesmos animais e no mesmo tempo a concentração de Sb, foi  $0,356 \pm 0,112 \mu\text{g/g}$ , ou seja, mais do que três vezes o nível quantificado no plasma. Esses resultados sugerem que durante a fase rápida de eliminação o Sb está mais concentrado no plasma, enquanto na fase lenta (residual) a concentração é maior no interior dos eritrócitos.

No estudo de Otto & Maren (1950) (*apud* Valladares *et al.*, 1996) e Molokhia & Smith (1969) também foi relatado o acúmulo do antimônio trivalente em eritrócitos. O antimônio pentavalente quase não penetra nos eritrócitos (Molokhia & Smith, 1969; Otto *et al.*, 1947). Esses resultados sugerem que após o primeiro tratamento a espécie mais abundante é o antimônio pentavalente, presente em maior quantidade no plasma.

O antimônio encontrado na urina está principalmente na forma pentavalente (Miekeley *et al.*, 2002). É possível que a forma que penetra no interior das células seja mais lentamente excretada (Molokhia & Smith, 1969) o que levaria ao acúmulo nos tecidos, como foi sugerido anteriormente por Goodwin & Page (1943).

Em seres humanos tratados com AM durante 60 dias ( $5 \text{ mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$ ), foi observada uma correlação ( $R^2=0,9713$ ) entre as concentrações de antimônio encontradas no sangue total e no plasma, sugerindo que não existe diferença entre os diferentes componentes do sangue (Miekeley *et al.*, 2002).

A quantificação de antimônio residual nos diferentes tecidos de macacos Rhesus tratados com AM mostrou que, em relação a este componente de eliminação lenta, o maior acúmulo ocorre na tireóide, no fígado, no baço e na vesícula ( $4,2$  a  $2,2 \mu\text{g/g}$ ). Nos pulmões, pele, rins e linfonodos as concentrações variaram de  $0,9$  a  $0,5 \mu\text{g/g}$ . Nos outros tecidos as concentrações de antimônio foram menores, *e.g.*, no coração, no cerebelo, na bexiga, no cérebro, no estômago, no dente e no pâncreas, os níveis não ultrapassaram  $0,27 \mu\text{g/g}$ . Os resultados aqui apresentados sugerem que não existem diferenças expressivas de antimônio acumulado nos diferentes órgãos, entre os grupos tratados com  $5$  ou  $20 \text{ mg Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$ . Não foi encontrado na literatura nenhum estudo que

tivesse determinado a distribuição do antimônio residual por diferentes órgãos após o tratamento com doses repetidas.

O acúmulo de antimônio foi observado em tecidos de hamsters infectados com *Leishmania donovani* e tratados com uma dose única de ES. As concentrações foram maiores em pele e no baço, 30 minutos após a coleta, e maiores no fígado 72 horas depois do tratamento (Berman *et al.*, 1988). O maior acúmulo no fígado também foi constatado após o tratamento intramuscular e intravenoso de camundongos tratados com AM (Ferroni *et al.*, 1987).

Alterações histopatológicas foram notadas no fígado, no baço e nos rins de hamsters infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com Sb<sup>V</sup> e Sb<sup>III</sup>. Os efeitos nefrotóxicos encontrados muito provavelmente resultaram do acúmulo do antimônio nos túbulos renais (Veiga *et al.*, 1985). Resultados semelhantes foram descritos para outros metais pesados (Gagliardi *et al.*, 1984). Digno de registro é o fato de hamsters infectados com *Leishmania garnhami* e tratados com AM apresentarem concentrações elevadas de antimônio nas lesões.

Em síntese, aparentemente a espécie de antimônio acumulada é a trivalente, a mais tóxica, mas também a com maior ação leishmanicida. O acúmulo do antimônio em lesões, e em alguns tecidos, parece ser importante para o tratamento das leishmanioses cutânea e visceral, embora o reaparecimento das lesões em três, dos seis macacos tratados com a dose de 5 mg Sb<sup>V</sup>/kg, sugira que a eficácia dos antimoniais esteja relacionada aos níveis circulantes de antimônio e não ao acumulado. Por outro lado, o acúmulo de antimônio nos tecidos estudados deve ser avaliado quanto ao potencial risco de efeitos tóxicos.

## *II.6 Conclusões*

- Nas primeiras horas após o tratamento de macacos Rhesus com uma dose única de AM (i.m.) as concentrações de antimônio (fase rápida de eliminação) foram maiores no plasma do que nas hemácias.
- Durante a fase lenta de eliminação as concentrações de antimônio residual foram maiores nas hemácias do que no plasma dos macacos tratados com AM.
- Aproximadamente 60 dias após o término do tratamento (fase de eliminação lenta) foram encontrados níveis de antimônio residual, em ordem decrescente, nos seguintes órgãos: tireóide, fígado, baço, vesícula, pulmões, pele, rins, linfonodos, coração, cerebelo, bexiga, cérebro estômago, dente e pâncreas.
- Os níveis de antimônio residual encontrados nos diferentes tecidos analisados não variaram nos dois regimes de dose estudados.

**CAPÍTULO III – Estudo da cinética do antimoniato de meglumina (AM)  
administrado durante a lactação em ratos.**

### III. 1 Introdução

A infância é a faixa etária em que o risco epidemiológico e biológico para o desenvolvimento de leishmaniose são maiores. Dessa maneira os estudos fármaco- e toxicocinéticos dos medicamentos leishmanicidas deveriam ser realizados também nessa faixa da população.

Alguns estudos mostram que crianças frequentemente respondem de modo insuficiente a regimes terapêuticos contra a leishmaniose que são eficazes em adultos (Palácios *et al.*, 2001; Anabwani *et al.*, 1983; Bryceson *et al.*, 1985). Em um dos primeiros estudos com ES, a cura de crianças com leishmaniose visceral só ocorreu após o tratamento com doses quatro vezes maiores que as administradas a adultos (Kirk & Sati, 1947). Essa baixa eficácia poderia ser explicada pela menor exposição ao medicamento em virtude do *clearance* mais rápido do antimônio em crianças (Cruz *et al.*, 2007). O aumento das doses e da frequência de administração pode melhorar a eficácia terapêutica mas, por outro lado, pode elevar também o risco de efeitos tóxicos.

A exposição de crianças ao antimônio pode ocorrer ainda na vida intra-uterina (Miranda *et al.*, 2006). No estudo de Miranda e colaboradores (2006) ratas Wistar foram tratadas com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de AM durante a gravidez e o antimônio foi determinado no sangue dos fetos a termo. Neste estudo a concentração de antimônio no sangue do feto foi cerca de 30% da concentração no sangue das respectivas mães, indicando que há transferência através da placenta.

Em princípio, o tratamento das mães com medicamentos a base de antimônio, durante o período de lactação, também pode levar à exposição dos filhotes. Durante o tratamento intravenoso de uma paciente com estibogluconato de sódio (ES) por 14 dias, foi encontrado antimônio no leite materno (Berman *et al.*, 1989). Entretanto, Berman *et al.* (1989) também trataram dois hamsters por via oral, mas não detectaram antimônio nos filhotes, concluindo que, mesmo passando para o leite, o antimônio não seria absorvido por via oral.

Outros estudos, todavia, sugerem que o antimônio também é absorvido por via oral. A administração de sais de antimônio trivalente a ratos, adicionado à água de beber, durante 14 semanas, permitiu a detecção do metal no sangue 6 semanas após o fim da exposição, confirmando que ocorre absorção oral (Poon *et al.*, 1998). Em mulheres, foram encontrados níveis de antimônio no soro sanguíneo e no leite, após a exposição a alimentos contaminados com este metal (Wappelhorst *et al.*, 2002). Filhotes de camundongos cujas mães foram expostas durante a lactação a antimônio radioativo,



apresentaram níveis detectáveis no sangue provenientes provavelmente do leite materno (Gerber *et al.*, 1982). Após o tratamento por via oral com uma dose única de AM, camundongos exibiram níveis detectáveis de antimônio em até 12 horas após a administração (Demicheli *et al.*, 2004).

A passagem do antimônio proveniente de medicamentos leishmanicidas para o leite foi avaliado neste estudo a fim de determinar se essa via de exposição é relevante na infância. Não foram encontrados estudos que tivessem investigado a passagem de antimônio para o leite materno e deste para o lactente.

## ***III.2 Objetivos***

### ***III.2.1 Objetivo geral***

Avaliar em ratos tratados com AM, a passagem do antimônio do sangue para o leite materno e deste para os filhotes.

### ***III.2.2 Objetivos específicos***

- Verificar se há a passagem do antimônio para o leite materno quando as mães são tratadas com AM por via subcutânea (parte I e II).
- verificar se há passagem do antimônio do leite materno para os filhotes, quando as mães são tratadas com AM (parte I e II).

### ***III.3 Materiais e métodos***

O estudo da passagem do antimônio durante a lactação foi realizado em duas etapas (parte I e parte II).

#### ***III.3.1 Desenho experimental (parte I)***

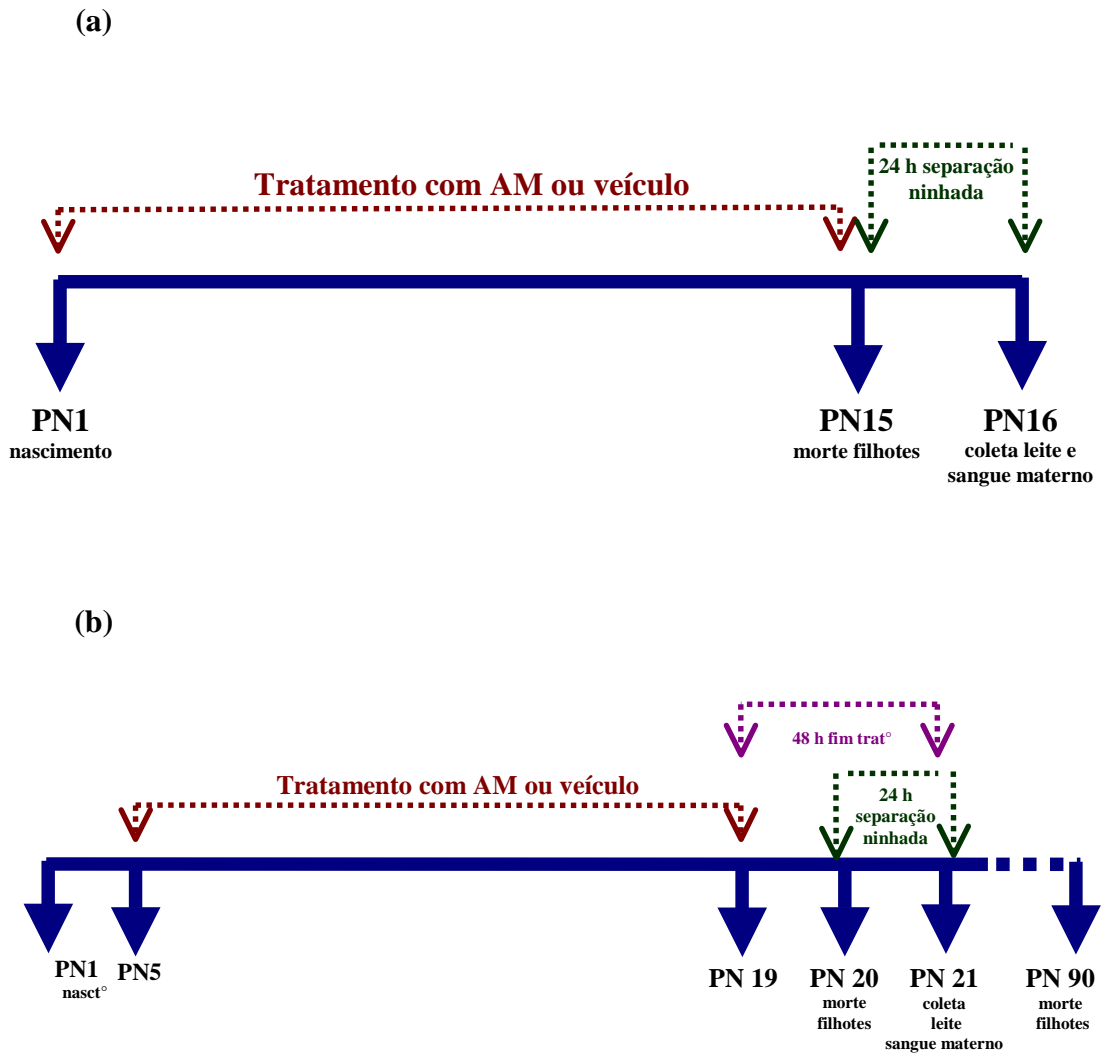
##### ***III. 3.1.1 Animais***

Foram utilizadas ratas Wistar grávidas fornecidas pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ. As ratas foram mantidas em gaiolas individuais em condições padrão de temperatura ( $21\pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade (aproximadamente 70%) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Água filtrada e ração (Nuvital<sup>®</sup>, Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) foram fornecidas *ad libitum*.

##### ***III. 3.1.2 Tratamento de ratas lactantes com antimoniato de meglumina ou veículo por via subcutânea***

No dia do nascimento os filhotes foram redistribuídos entre as mães de modo que as ninhadas fossem padronizadas sendo constituídas por quatro fêmeas e quatro machos. O tratamento das mães foi realizado por via subcutânea, na região dorsal, com a dose de 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de peso corpóreo de AM ou com o veículo (grupo controle) por 15 dias consecutivos. O tratamento foi iniciado no 1º dia de vida pós-natal (PN1) dos filhotes (**Figura III.1a**)

O veículo utilizado foi uma solução aquosa de metabissulfito de potássio (1,6 mg/mL) e sulfito de sódio (0,18 mg/mL). Os volumes de administração do veículo e do antimoniato de meglumina foram corrigidos diariamente considerando o peso corpóreo do animal e a quantidade de antimônio na formulação do medicamento (Glucantime<sup>®</sup>). As mães e os filhotes foram pesados e os sinais gerais de toxicidade observados ao longo do período de tratamento foram registrados.



**Figura III.1** Esquemas de tratamento e coleta das amostras do estudo da cinética do antimônio durante a lactação em ratas tratadas com AM

### ***III.3.1.3 Coleta de sangue dos filhotes e sangue e leite materno***

No último dia de tratamento (PN15), os filhotes foram separados de suas mães, pesados individualmente, anestesiados e sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado, a massa determinada e os tubos armazenados a -20°C para posterior quantificação de antimônio total.

Após a separação de suas respectivas ninhadas, as ratas foram mantidas por mais 24 horas em gaiolas individuais. No dia seguinte à última injeção do AM as ratas foram gentilmente imobilizadas, e receberam massagem nas mamas a fim de estimular a liberação de leite. O leite foi recolhido em tubos de polipropileno, a massa foi determinada e os tubos armazenados a -20°C. A coleta de leite foi realizada de acordo com o método de Delonges *et al.*, (1997) modificado.

Após a coleta do leite, as mães foram anestesiadas e sacrificadas por decapitação. O sangue foi coletado, a massa foi determinada e os tubos foram armazenados a -20°C. Os fígados das mães também foram retirados e pesados.

### ***III.3.2 Desenho experimental - parte II***

#### ***III. 3. 2. 1 Animais***

Foram utilizadas ratas Wistar grávidas fornecidas pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ. As ratas foram mantidas em gaiolas individuais em condições padrão de temperatura ( $21\pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade (aproximadamente 70%) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Água filtrada e ração (Nuvital<sup>®</sup>, Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) foram fornecidas *ad libitum*.

#### ***III. 3. 2 .2 Tratamento de ratas lactantes com antimoniato de meglumina, ou veículo por via subcutânea***

No dia do nascimento, os filhotes foram redistribuídos entre as mães de modo que cada ninhada fosse constituída por quatro fêmeas e quatro machos. O tratamento das mães foi realizado por via subcutânea, na região dorsal, com a dose de

300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de peso corpóreo de AM ou com o veículo (grupo controle) por 15 dias consecutivos. O tratamento foi iniciado no 5° dia de vida pós-natal (PN5) dos filhotes e terminou no dia 19 (PN19) (**Figura III.1b**)

O veículo utilizado foi uma solução aquosa de metabissulfito de potássio (1,6 mg/mL) e sulfito de sódio (0,18 mg/mL). O volume administrado do veículo e do AM foram corrigidos diariamente considerando o peso corpóreo do animal e a quantidade de antimônio na formulação do medicamento (Glucantime®). As mães e os filhotes foram pesados e os sinais gerais de toxicidade observados ao longo do período de tratamento foram registrados.

### ***III.3.2.3 Coleta de sangue dos filhotes e sangue e leite materno***

Os filhotes foram separados de suas mães 24 horas após o fim do tratamento (PN21), pesados individualmente, anestesiados e sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado, a massa foi determinada e os tubos foram armazenados a -20°C para posterior quantificação de antimônio total. Cinco filhotes de diferentes ninhadas foram mantidos por mais 90 dias quando foram então sacrificados, sendo o sangue coletado como descrito anteriormente.

As ratas, separadas de suas respectivas ninhadas, foram mantidas por mais 24 horas em gaiolas individuais. As coletas de leite e sangue materno foram realizadas 48 horas após o fim do tratamento e processadas como descrito anteriormente (item **III.3.1.3**).

Alguns órgãos (fígado, rins, coração, pulmões e baço) das mães e dos filhotes foram retirados e pesados.

### ***III.3.3 Digestão das amostras de sangue e leite e quantificação de antimônio por ICP-MS (Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado)***

Essa etapa do estudo foi realizada no laboratório de ICP-MS da PUC-Rio, coordenado pelo Prof. Dr. Norbert Miekeley.

Após o descongelamento das amostras de sangue, foram adicionados 2,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado aos tubos contendo massa conhecida da amostra. Os tubos com

as amostras foram colocados em chapa de aquecimento à aproximadamente 95°C por 16 horas. Ao final da digestão foram adicionados padrão interno ( $^{115}\text{In}$ ) e água deionizada (18M $\Omega\text{cm}$ ), até o volume final de 10 mL (diluição final: 1:10), nas amostras obtidas de animais tratados apenas com o veículo. As amostras de sangue dos animais tratados foram diluídas 100 ou 1000 vezes, sendo a adição do padrão interno realizada na última etapa da diluição.

A quantificação de antimônio total ( $\text{Sb}^{121}$  e  $\text{Sb}^{123}$ ) foi realizada por ICP-MS em aparelho ELAN 5000 A (Perkin-Elmer, Sciex, USA) equipado com nebulizador Meinhard e uma câmara de nebulização ciclônica (ambos da Glass Expansion, AU).

Os valores foram corrigidos pelo fator de diluição e pela massa da amostra biológica determinada no momento da coleta.

#### ***III.3.4 Análise estatística***

A comparação estatística para as variáveis que apresentaram distribuição normal (paramétrica) foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste  $t$  de Student. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### ***III.4 Resultados***

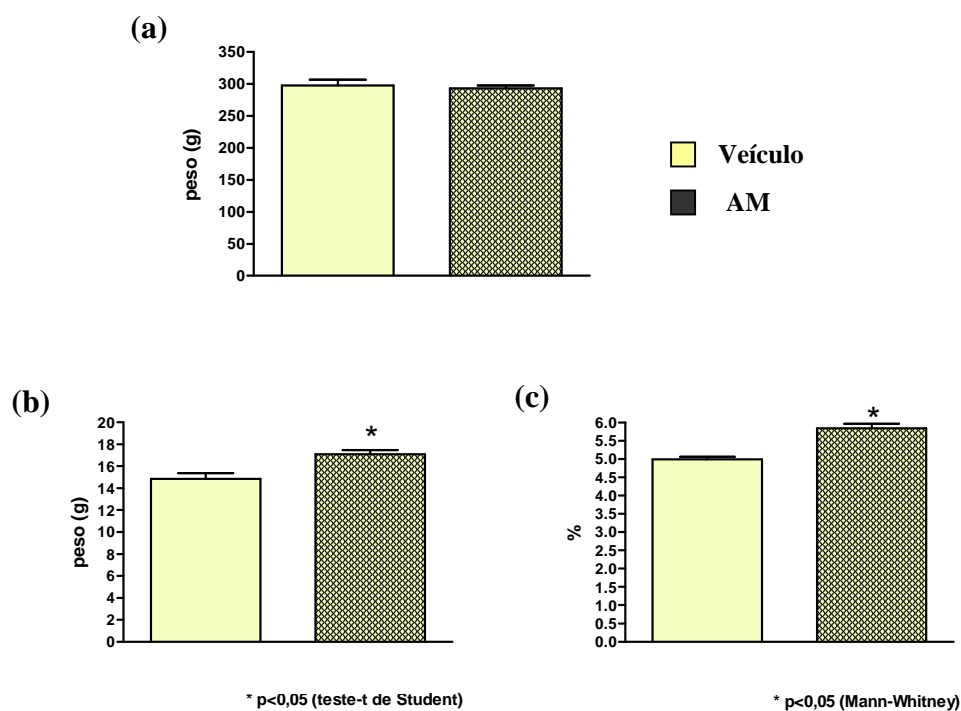
#### ***III.4.1 Resultados – parte I***

##### ***III.4.1.1 Pesos corpóreos das mães, filhotes e peso do fígado materno.***

Não houve alteração do peso corpóreo das mães tratadas com veículo ou AM durante o período de lactação (**Figura III. 2 (a)**). Os pesos absolutos e relativos dos fígados maternos no grupo tratado com AM durante a lactação apresentaram aumento de aproximadamente 10% quando comparados com o grupo tratado apenas com veículo (**Figura III. 2 (b) e (c)**).

Não foram observadas alterações do peso corpóreo dos filhotes de mães tratadas com veículo ou AM (**Tabela III.1**).





**Figura III. 2:** Peso corpóreo (a) e peso absoluto (b) e relativo (c) do fígado de ratas Wistar tratadas com veículo ou 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de AM durante a lactação (média±DP).

**Tabela III.1:** Médias (±DP) dos pesos corpóreos dos filhotes. Filhotes individuais como unidade de análise.

| GRUPOS  | PESO CORPÓREO |            |                 |
|---------|---------------|------------|-----------------|
|         | Fêmeas        | Machos     | Fêmeas + Machos |
| Veículo | 29,39±2,19    | 29,94±2,13 | 29,66±2,19      |
| AM      | 27,42±2,32    | 29,07±2,26 | 28,07±2,36      |

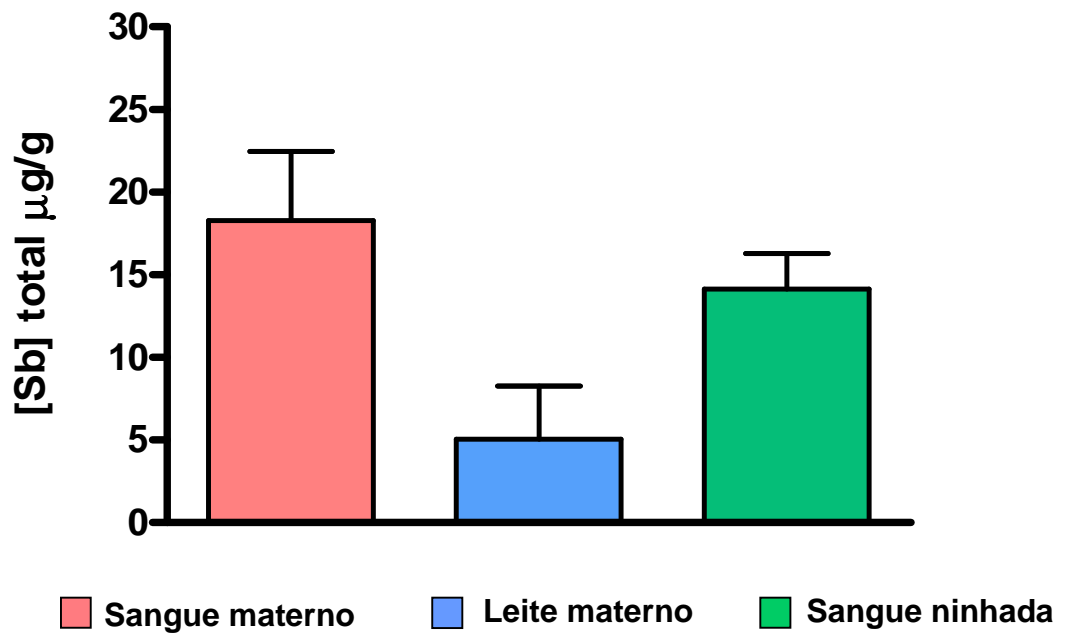
Valores: Média±DP

### *III.4.1.2 Concentração de antimônio total no sangue e no leite maternos e no sangue de filhotes*

Nas amostras de leite, os níveis de antimônio (média±DP; 5,07±3,03µg/g) foram equivalentes a 25% das concentrações do metal no sangue materno (18,30±3,93µg/g). No sangue dos filhotes o nível de antimônio (14,14±2,05µg/g) foi de aproximadamente 77% das concentrações determinadas no sangue materno (**Figura III. 3**). No grupo tratado com veículo foram encontradas concentrações extremamente baixas de antimônio (**Tabela III.2**).

**Tabela III.2** Concentração de antimônio (µg/g) (média±DP) no sangue e no leite maternos e no sangue dos filhotes de ratas tratadas com veículo ou 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de antimoniato de meglumina (AM 300) durante 15 dias por via subcutânea.

|                | <b>Sangue mães</b>    | <b>Leite</b>          | <b>Sangue filhotes</b> |
|----------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>Veículo</b> | 0,004±0,011<br>(n=11) | 0,002±0,003<br>(n=11) | 0,037±0,041<br>(n=11)  |
| <b>AM 300</b>  | 18,297±4,163          | 5,072±3,180           | 14,140±2,138           |



**Figura III. 3:** Concentração de antimônio total (média±DP) no sangue e no leite maternos e no sangue de filhotes de ratas Wistar tratadas com 300 mg  $Sb^V/kg$  de AM do dia PN1 ao dia PN15 por via subcutânea.

### **III.4.2 Resultados – parte II**

#### **III.4.2.1 Peso corpóreo e peso absoluto e relativo dos órgãos das mães e dos filhotes.**

O peso corpóreo das ratas tratadas com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de antimoniato de meglumina por via subcutânea, durante 15 dias, do dia PN5 ao dia PN 19, não diferiu daquele das que foram tratadas apenas com o veículo (**Tabela III. 3**). Os pesos absolutos dos órgãos das mães tratadas com AM diferiram dos pesos das ratas controle, com exceção do baço que apresentou aumento de cerca de 80% quando comparado ao grupo tratado com veículo. Os pesos relativos de rins, pulmões e baço também tiveram aumento significativo (15%, 36% e 91% respectivamente) (**Tabela III. 3**).

Os filhotes de ratas tratadas com antimoniato de meglumina 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia (AM 300) por via subcutânea durante 15 dias (dia PN5 ao dia PN19) apresentaram reduções significativas do peso corpóreo (aproximadamente 12%) (**Tabela III. 4**).

Os pesos absolutos dos órgãos dos filhotes são apresentados na **Tabela III. 4**. Com exceção do baço, que não foi alterado, os pesos relativos de fígado, rins e pulmões também mostraram diferenças significativas quando comparados com os filhotes de mães tratadas com veículo (**Tabela III. 4**).

Nas amostras de leite e sangue dos animais tratados com veículo foram encontrados níveis detectáveis de antimônio, cerca de mil vezes menores que os encontrados nas amostras do grupo tratado com AM (**Tabela III. 5**).

**Tabela III. 3** Peso corpóreo e pesos absolutos (PA) e relativos (PR) dos órgãos de ratas tratadas via subcutânea durante o período da lactação com veículo (n=6) ou antimoniato de meglumina 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia (AM 300) (n=6).

|         |       | Peso corpóreo | Fígado     | Rins      | Coração   | Pulmões   | Baço      |
|---------|-------|---------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Veículo | PA    |               |            |           |           |           |           |
|         | (g)   | 311,50±20,40  | 14,45±0,54 | 2,28±0,13 | 1,39±0,29 | 1,43±0,13 | 0,75±0,09 |
|         | PR    |               |            |           |           |           |           |
|         | (%)   | -             | 4,65±0,35  | 0,73±0,05 | 0,45±0,08 | 0,46±0,04 | 0,24±0,02 |
| AM 300  | PA    |               |            |           |           |           |           |
|         | (g)   | 294,17±11,07  | 16,70±2,60 | 2,49±0,24 | 1,18±0,08 | 1,86±0,33 | 1,35±0,17 |
|         | P     |               |            |           |           |           |           |
|         | valor | ns            | ns         | ns        | ns        | ns        | <0,0001   |
|         | PR    |               |            |           |           |           |           |
|         | (%)   | -             | 5,67±0,82  | 0,84±0,06 | 0,40±0,03 | 0,63±0,10 | 0,46±0,05 |
| P       |       |               |            |           |           |           |           |
| valor   | -     | ns            | 0,0087     | ns        | 0,0043    | 0,0022    |           |

Valores: Média±DP; ns- não significativo. Análise estatística: PA – Anova seguido de teste *t* de Student; PR – Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .

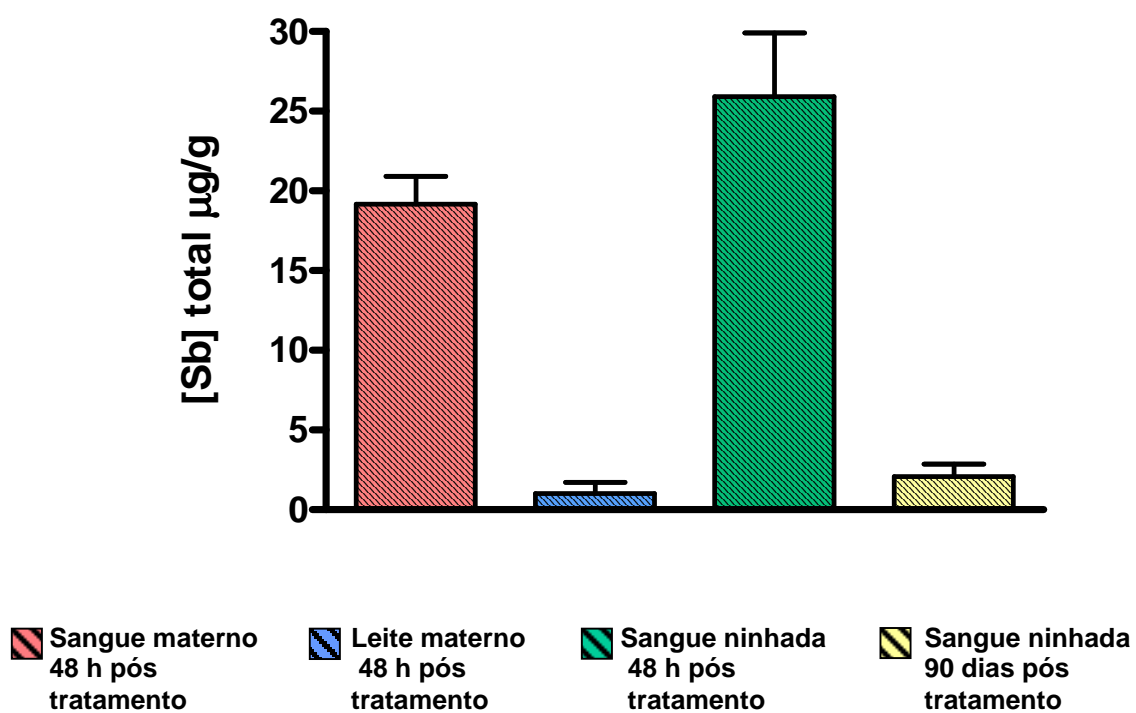
**Tabela III. 4** Peso corpóreo e pesos absolutos e relativos dos órgãos dos filhotes de ratas tratadas via subcutânea durante o período da lactação com veículo (n=21) ou 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de antimoniato de meglumina (AM) (n=23).

|         |       | Peso corpóreo | Fígado    | Rins      | Coração   | Pulmões   | Baço      |
|---------|-------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Veículo | PA    |               |           |           |           |           |           |
|         | (g)   | 41,20±3,33    | 1,47±0,16 | 0,53±0,05 | 0,26±0,04 | 0,48±0,06 | 0,19±0,04 |
|         | PR    |               |           |           |           |           |           |
|         | (%)   | -             | 2,63±1,50 | 0,94±0,51 | 0,48±0,32 | 0,85±0,47 | 0,33±0,17 |
| AM 300  | PA    |               |           |           |           |           |           |
|         | (g)   | 36,54±4,37    | 1,29±0,21 | 0,48±0,08 | 0,24±0,04 | 0,42±0,04 | 0,19±0,06 |
|         | P     |               |           |           |           |           |           |
|         | valor | <0,0001       | 0,0037    | 0,00173   | 0,0240    | 0,0007    | ns        |
|         | PR    |               |           |           |           |           |           |
|         | (%)   | -             | 2,49±1,32 | 0,93±0,50 | 0,46±0,25 | 0,87±0,68 | 0,36±0,19 |
|         | P     |               |           |           |           |           |           |
|         | valor | -             | 0,0037    | 0,0127    | ns        | 0,0006    | ns        |

Valores: Média±DP; ns- não significativo. Análise estatística: PA – Anova seguido de teste-T; PR – Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney. Diferenças significativas quando p<0,05.

#### **III.4.2.2 Concentração de antimônio total no sangue e leite materno e sangue de filhotes.**

Nas amostras de leite foi encontrado antimônio (média±DP; 0,84±0,74 µg/g) em concentrações que correspondem a cerca de 4% dos níveis encontrados no sangue materno (19,15±1,77µg/g). No sangue dos filhotes coletado 48 horas após o fim do tratamento a concentração média de antimônio foi: 26,15±3,89 µg/g. Os filhotes sacrificados 90 dias após o fim do tratamento ainda apresentaram antimônio detectável no sangue (2,10± 0,77 µg/g) (**Figura III.4**).



**Figura III. 4:** Concentração de antimônio total (média±DP) no sangue e leite maternos e no sangue de filhotes de ratas Wistar tratadas com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de AM durante a lactação.

**Tabela III.5** Concentração de antimônio (média±DP) em sangue e leite materno e sangue de filhotes de ratas tratadas com veículo durante 15 dias por via subcutânea ou 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de antimoniato de meglumina (AM 300).

|                | <b>Sangue mães</b>    | <b>Leite</b>         | <b>Sangue filhotes</b> | <b>Sangue filhotes 90 dias após o tratamento</b> |
|----------------|-----------------------|----------------------|------------------------|--|
| <b>Veículo</b> | 0,024±0,021<br>(n=3)  | 0,003±0,006<br>(n=3) | 0,443±0,000<br>(n=11)  | ND   |
| <b>AM 300</b>  | 19,151±1,767<br>(n=6) | 1,008±0,693<br>(n=6) | 25,925±3,990<br>(n=23) | 2,099±0,766<br>(n=5)                             |

**ND** – não determinado



### ***III.5 Discussão***

A lactação é a fonte mais importante de nutrientes durante os primeiros meses de vida e, também, tem papel crucial na redução da mortalidade por doenças infecciosas, principalmente nos países em desenvolvimento (OMS, 2008). A qualidade do leite materno deve ser assegurada e é importante estudar a passagem de xenobióticos para o leite porque esta pode ser uma via de exposição de crianças a contaminantes.

O arsênio, metalóide situado imediatamente acima do antimônio na tabela periódica, o chumbo, o cádmio, o manganês e o mercúrio (Sharma & Pervez, 2005; Ursinyova & Masanova, 2005; Gundacker *et al.*, 2002), passam para o leite materno e deste para o bebê (Samanta *et al.*, 2007; Sharma & Pervez, 2005; Gerber *et al.*, 1982). A passagem para o leite materno do antimônio presente no alimento foi demonstrada em camundongos (Gerber *et al.*, 1982) e também em estudos epidemiológicos (Wappelhorst *et al.*, 2002).

No presente estudo, foram detectados níveis elevados de antimônio no leite materno de ratas tratadas com AM durante 15 dias a partir do nascimento da prole (PN1). Nas amostras de sangue e leite materno, e no sangue dos filhotes do grupo tratado apenas com o veículo foram detectadas concentrações muito baixas de antimônio. Entretanto, tais níveis são cerca de mil vezes menores que os encontrados após o tratamento com AM.

No último dia de tratamento as ninhadas foram separadas de suas respectivas mães. As coletas do sangue e do leite materno foram realizadas 24 horas após a separação, uma vez que esse intervalo de tempo, determinado a partir de testes realizados anteriormente, mostrou ser adequado para obter o volume necessário de leite para a dosagem de antimônio (dados não mostrados). Embora tenham sido coletados no mesmo momento, as amostras de sangue e de leite materno apresentaram concentrações de antimônio diferentes e a razão de concentração sangue/leite foi de 3,61. Em estudo realizado com uma paciente tratada com ES a razão soro sanguíneo/leite de antimônio foi de 0,2 (Berman *et al.*, 1989). É importante destacar que no estudo de Berman e colaboradores (1989), o antimônio foi quantificado no soro sanguíneo enquanto que nosso estudo ele foi medido no sangue total. Alguns estudos já demonstraram que o antimônio pode acumular em diferentes componentes do sangue como os estudos de Otto & Maren (1950) *apud* Valladares *et al.*, 1996, Molokhia & Smith (1969) e nos resultados de macacos Rhesus mostrados no Capítulo II.

A passagem do antimônio para o leite materno foi observada anteriormente em uma paciente de leishmaniose cutânea tratada durante 14 dias por via intravenosa com 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg de peso corpóreo/dia de ES (Berman *et al.*, 1989). Nessa paciente, o pico da concentração do antimônio no soro foi obtido aos 15 minutos (85 µg/mL) e, cerca de 6 horas depois, os níveis foram baixos. No leite materno dessa paciente, os maiores (3,5 µg/mL) e menores (0,7 µg/mL) níveis de antimônio foram registrados 4 e 23 horas após o tratamento, respectivamente.

A passagem de radioisótopos de antimônio para o leite materno de camundongos (Gerber *et al.*, 1982) e de seres humanos (Wappelhorst *et al.*, 2002) e a sua absorção oral em ratos (Poon *et al.*, 1998), foram demonstradas por outros autores. Entretanto, Berman e colaboradores (1989) sugeriram que o antimônio seria pouco absorvido por via oral uma vez que hamsters tratados por esta via, com a dose de 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg, não apresentaram níveis detectáveis de antimônio. Em virtude desta dificuldade, os níveis de antimônio que passariam para a prole através do leite seriam muito baixos e não representariam risco de toxicidade. É digno de nota que mesmo a exposição a alguns xenobióticos, em baixas doses, poderia desencadear efeitos adversos em parâmetros reprodutivos e neurológicos (Grote *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2006; Narita *et al.*, 2006; Schonfelder *et al.*, 2004).

A absorção oral do antimônio presente no AM foi observada em camundongos tratados com dose única. O maior nível plasmático de antimônio (1 µg/mL) foi observado 30 minutos depois do tratamento e esses níveis declinaram rapidamente até o último tempo observado (12 horas) (Demicheli *et al.*, 2004).

A exposição a substâncias tóxicas no início do desenvolvimento pode levar ao aparecimento de efeitos adversos mais tarde na vida do indivíduo. Durante a gravidez e/ou lactação, a exposição a metais como o mercúrio, chumbo e cádmio, pode também levar ao desencadeamento de efeitos neurotóxicos importantes (Monnet-Tschudi *et al.*, 2006; Desi *et al.*, 1998; Antonio *et al.*, 1998).

### *III.6 Conclusões*

- O antimônio presente no antimoniato de meglumina passa para o leite materno de ratas tratadas com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia.
- Os filhotes de mães tratadas com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia absorveram por via oral o antimônio presente no leite materno.

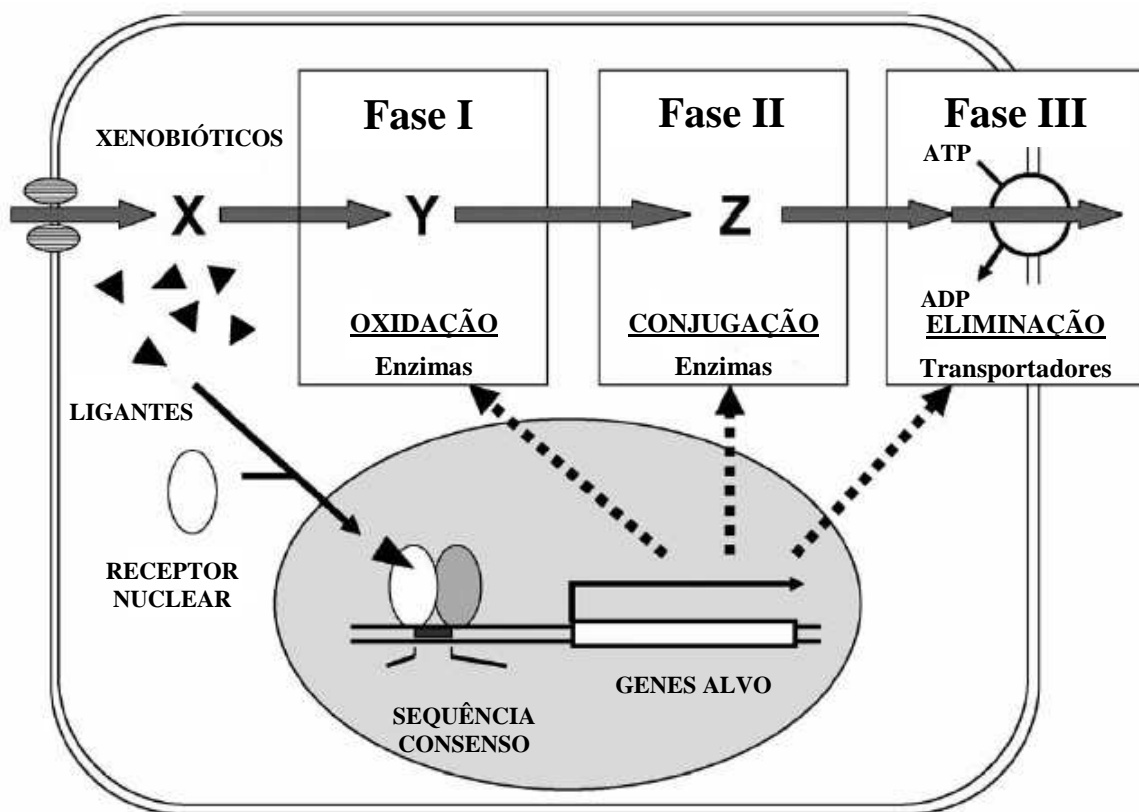
**CAPÍTULO IV – Avaliação da alteração de citocromos P450 (CYP) em ratos  
Wistar tratados com antimoniato de meglumina (AM)**

#### ***IV. 1 Introdução a biotransformação***

A biotransformação de xenobióticos, *e. g.* medicamentos, poluentes e aditivos alimentares, converte substâncias lipofílicas em compostos mais polares, o que facilita a excreção. Como os metabólitos produzidos são em geral menos tóxicos do que a molécula original, o processo de biotransformação é fundamental para a *desintoxicação*. Entretanto em alguns casos há produção de metabólitos mais reativos do que a molécula original o que pode causar efeitos tóxicos. Neste último caso, diz-se que ocorreu *ativação metabólica*.

O processo de biotransformação de substâncias químicas pode ser dividido em fases I, II e III (**Figura IV. 1**). A fase I consiste da adição ou exposição de um grupamento funcional e envolve reações de oxidação, redução, hidrólise ou hidratação (Gibson & Skett, 1994). Os produtos da fase I podem servir como substratos para reações de fase II que consistem, por sua vez, na conjugação desses metabólitos com substratos endógenos, tais como aminoácidos, glutatona e sulfato. A fase III de desintoxicação foi proposta por Ishikawa em 1992 e envolveria o transporte do produto da fase II para fora da célula. Esse transporte é realizado através de proteínas dependentes de ATP que agem como bombas de efluxo, como a grande família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (Ishikawa, 1992).

As enzimas citocromo P450 (CYP) catalisam cerca de 80% das reações de oxidação da fase I da biotransformação (**Figura IV. 2**) (Evans & Relling, 1999). As CYP (famílias CYP 1-4) podem desintoxicar ou ativar grande número de xenobióticos (Guengerich, 1987), além de participar da biossíntese ou catabolismo de hormônios esteróides, ácidos biliares, vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos e eicosanóides (geralmente da família CYP 5 em diante) (Parkinson, 2001).



**Figura IV. 1:** Fases I, II e III de biotransformação de xenobióticos.

Modificado de Nakata *et al.*, 2006

### **Reações de oxidação**

#### **a) Citocromo P450:**

Hidroxilação aromática, hidroxilação alifática, epoxidação, N-desalquilação, O-desalquilação, S-desalquilação, desaminação oxidativa, N-oxidação

#### **b) Outras enzimas:**

**Álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, xantina oxidase, amina oxidase, aromatase, alquilhidrazina oxidase**

**Figura IV. 2:** Reações de oxidação catalisadas por CYP e por outras enzimas de fase I. Fonte: Gibson & Skett, 1994.

#### ***IV. 1. 1 Classificação, estrutura, localização e função das CYP***

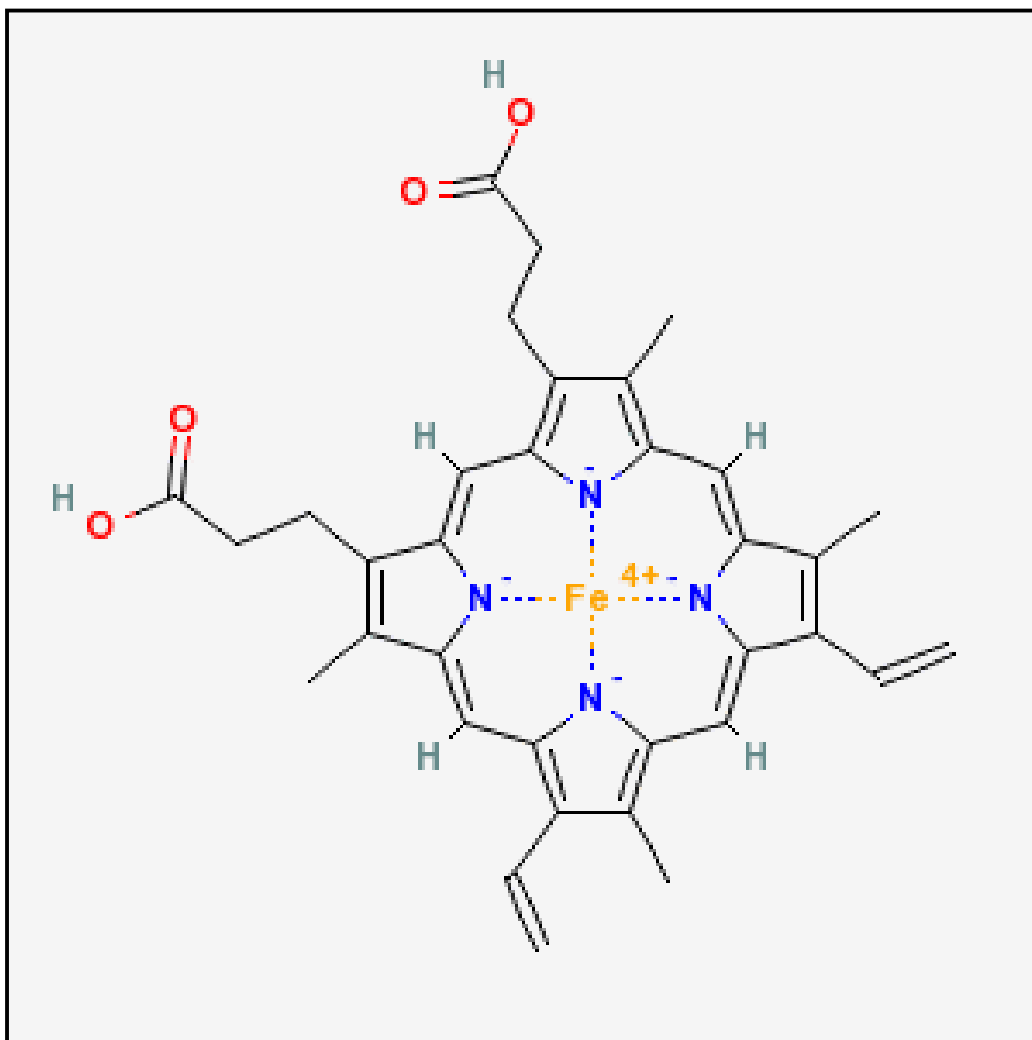
A denominação citocromo P450 foi proposta após a identificação de um pigmento na célula com absorção espectral máxima a 450 nm, quando reduzido e ligado ao monóxido de carbono (Omura & Sato, 1962).

A superfamília gênica das CYP inclui dezenas de famílias, *i.e.* enzimas, com cerca de 40% de homologia que são identificadas por um número arábico após a sigla, tais como CYP1, CYP2, CYP3 e CYP4. A escolha do número pode ser arbitrária ou estar relacionada à função da família, *e.g.* a CYP21 atua como hidroxilase na posição 21 de esteróides (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). As enzimas que constituem as subfamílias possuem maior similaridade de seqüências (pelo menos 55%) e estas são identificadas por uma letra após o número que identifica a família, como CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2E, CYP3A e CYP4A. As isoenzimas são designadas por um número após a identificação das subfamílias, como CYP1A1, CYP2E1 e CYP2A3.

As diferentes isoformas de CYP podem ser encontradas em quase todas as espécies de seres vivos, como arqueobactérias, vegetais e animais (Nelson *et al.*, 1996). A quantidade pode variar conforme a espécie, desde 3 isoformas em *Saccharomyces cerevisiae*, 74 em *C. elegans*, 57 em seres humanos e até 102 em camundongos (Seliskar & Rozman, 2007).

A presença do grupo prostético, protoporfirina IX férrica (**Figura IV. 3**), inclui as CYP entre as hemoproteínas. O grupamento heme é o sítio de ligação do oxigênio e do substrato e, quando associado à enzima NADPH-citocromo P450 oxidoreductase (NPR), participa de um ciclo de oxi-redução do ferro, essencial para a função catalítica das CYP .





**Figura IV. 3:** Estrutura da protoporfirina IX.

Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=11967865>

(acesso em 27/01/08)

As CYP são capazes de ativar dois átomos de oxigênio que são fornecidos, na grande maioria das vezes, pela molécula de oxigênio. As exceções são as enzimas tromboxano sintase e aleno óxido sintase cuja fonte de oxigênio é o peróxido (Mansuy & Renaud, 1995 *apud* Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). O oxigênio se liga ao grupamento heme que, por sua vez, está ligada fortemente a proteína através do enxofre tiolato aniônico de um resíduo de cisteína. Esse tipo de ligação a proteína permite que o heme ative a molécula de oxigênio, separando os dois átomos. Um oxigênio é utilizado na formação de água - por isso as CYP são também denominadas oxidases de função mista - e o outro é introduzido no substrato - caracterizando a função de monooxigenase. Na maioria dos casos, o grupamento funcional adicionado ao substrato é uma hidroxila, mas as reações catalizadas pelas CYP podem incluir também epoxidação, desalquilação, isomerização e peroxidação (Zuber *et al.*, 2002).

As CYP estão ligadas às membranas do retículo endoplasmático liso (REL) e, em alguns casos, à membrana interna da mitocôndria (Nelson *et al.*, 2004). Quando o REL é rompido são formadas pequenas vesículas denominadas microssomos. Na face externa da membrana microssomal encontra-se o domínio catalítico da proteína (Sakaguchi *et al.*, 1987; Monier *et al.*, 1988; Szczesna-Skorupa & Kemper, 1989). As interações adicionais da proteína com a membrana, além de torná-la rígida, formam canais que permitem o acesso de diferentes tipos de substratos (Schleinkofer *et al.*, 2005). Por outro lado, a porção da enzima próxima ao grupamento heme encontra-se posicionada perpendicularmente à membrana, facilitando a interação e a transferência de elétrons da enzima NPR (Williams *et al.*, 2000). A NPR é uma proteína microssomal que contém uma flavoproteína e é intermediária na transferência de um elétron da molécula de NADPH para aceptores de elétrons como a heme oxigenase, o citocromo *b5* e as CYP (Strobel *et al.*, 1995 *apud* Higashimoto *et al.*, 2005). A razão molar de CYP e NPR varia de 10:1 a 25:1.

O ciclo catalítico das CYP em geral, ocorre em 8 etapas (Gibson & Skett, 1994) (Figura IV. 3)

- 1) ligação do substrato à forma oxidada (férica,  $\text{Fe}^{3+}$ ) da CYP;
- 2) transferência de um elétron derivado da  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  pela ação da NPR e a consequente redução para a forma ferrosa da CYP ( $\text{Fe}^{2+}$ );
- 3) ligação do oxigênio ao complexo CYP ferroso-substrato;
- 4) rearranjo de elétrons;

- 5) introdução de um segundo elétron geralmente derivado da NPR;
- 6, 7 e 8) etapas que resultam na introdução do oxigênio no substrato e liberação do produto final.

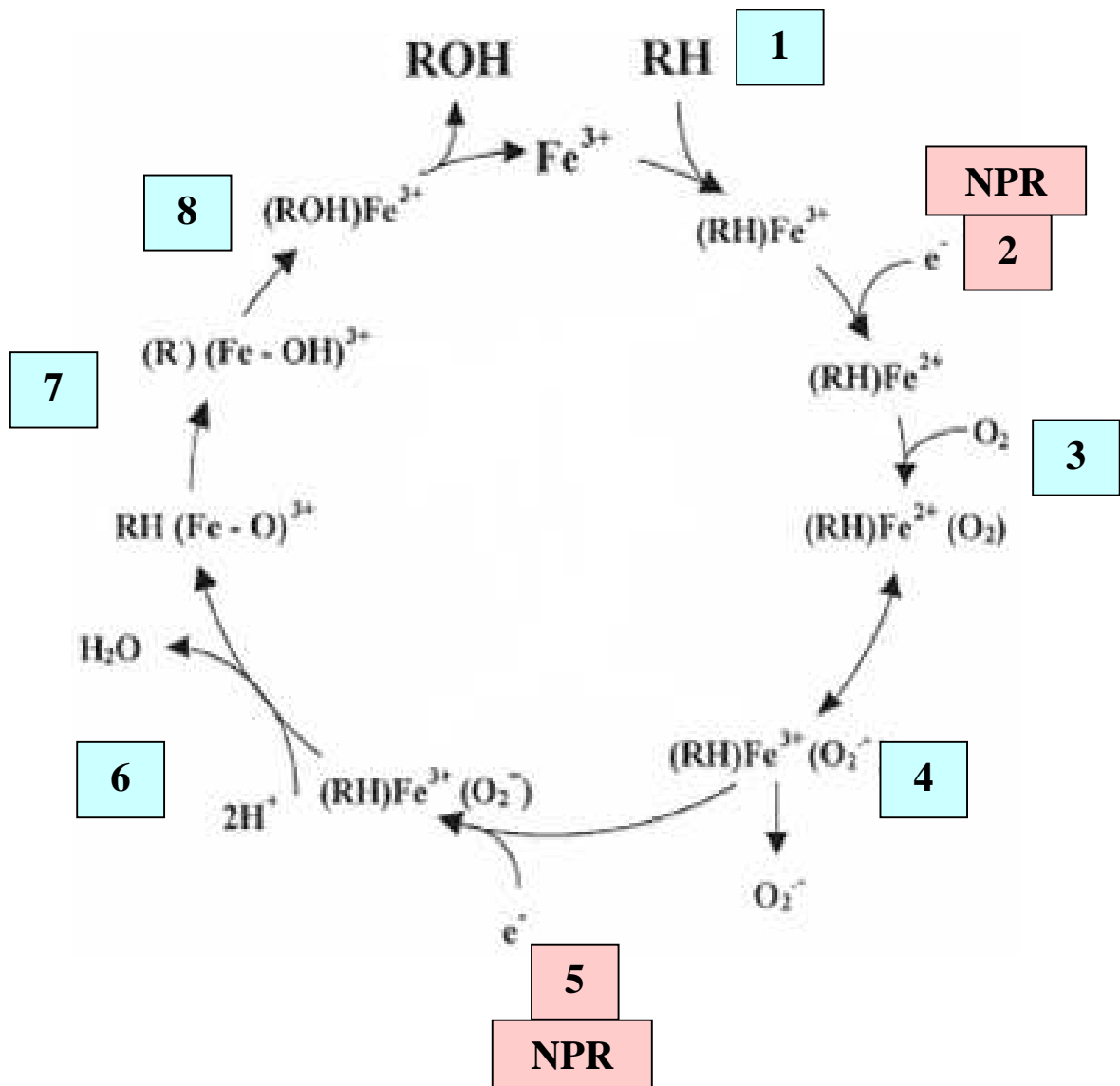


Figura IV. 4: Esquema geral do ciclo catalítico das CYP .

Modificado de: Isin & Guengerich, 2007

As CYP são encontradas em grande quantidade na fração microsomal hepática, mas também estão presentes em microsomos de diversos outros tecidos, tais como: pulmão, esôfago, rim, cérebro, coração e placenta (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001, Parkinson, 2001). As diferentes isoformas podem ter diferentes distribuições teciduais (**Tabela IV. 1**). Em populações de indivíduos da mesma espécie podem existir polimorfismos genéticos de CYP que resultam em alterações da atividade e tem reflexos no perfil metabólico. Além disso, a atividade de uma CYP pode ser modulada pela ligação de xenobióticos e/ou seus metabólitos a receptores nucleares e fatores de transcrição (**Figura IV. 1**).

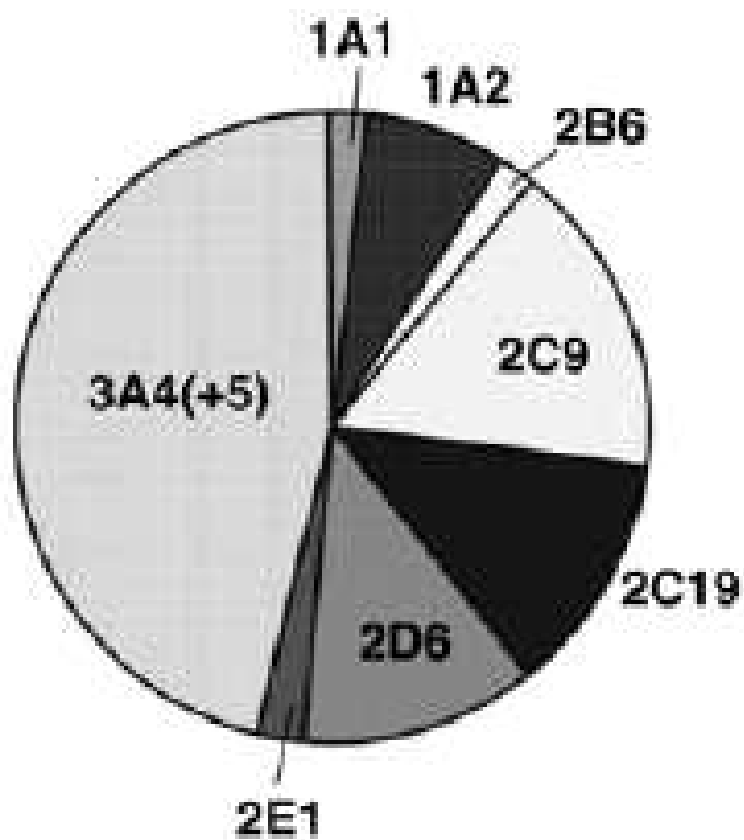
O metabolismo de um determinado substrato pode ser mediada por diferentes CYP e, por outro lado, uma única CYP pode catalisar a oxidação de uma grande variedade de substratos. Essa superposição de vias metabólicas faz com que, a interferência com a atividade de uma única isoenzima, possa levar a efeitos cruciais no metabolismo de um amplo espectro de xenobióticos.

**Tabela IV. 1:** Localização e principais substratos de algumas CYP em seres humanos.

| <b>CYP</b> | <b>Localização</b>   | <b>Substratos típicos</b>  |
|------------|--|--|
| 1A1        | pulmão, fígado, cérebro, trato gastrointestinal (TGI), linfócitos, coração | hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)  |
| 1A2        | fígado   | acetaminofen, aminas aromáticas, cafeína fenatecina, HPA, teofilina,   |
| 1B1        | pele, cérebro, coração, pulmão, placenta, fígado, rim, baço, TGI           | HPA  |
| 2A6        | fígado   | butadieno, cumarina, esteróides, nicotina  |
| 2B6        | fígado, coração  | benzefetamina, ciclofosfamida, ifosfamida, nicotina  |
| 2C8        | fígado, rim  | ácido aracdônico, carbamazepina, retinóides, taxol   |
| 2C9/10     | fígado   | diclofenaco, fenatecina, fenobarbital, piroxicam, tolbutamida  |
| 2C19       | fígado, coração  | acetaminofen, difenilhidantoína, (S)-mefenitoína, omeprazol  |
| 2D6        | fígado, cérebro, coração   | antidepressivos, betabloqueadores  |
| 2E1        | fígado, cérebro, pulmão, endotélio, coração, medula óssea                  | acetaminofen, anilina, benzeno, etanol, nitrosaminas, teofilina  |
| 3A4/5      | fígado, cérebro, TGI, rim, endotélio, placenta, linfócitos.                | acetaminofen, benzefetamina, bloqueadores de canais de cálcio, carbamazepina, ciclofosfamida, ciclosporina, esteróides, retinóides, taxol, teofilina |
| 4A9/11     | rim  | ácidos graxos  |

Fonte: Anzenbacher &amp; Anzenbacherová, 2001, Parkinson, 2001; Gibson &amp; Skett, 1994

A afinidade de uma CYP por diversos tipos de substratos faz com que as alterações da atividade desta enzima modifiquem o metabolismo de diversos xenobióticos. As isoformas CYP 1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A (**Figura IV. 4**) são as responsáveis pelo metabolismo de cerca de 70% dos medicamentos (Smith *et al.*, 1998). A CYP 2E1 é responsável pelo metabolismo de solventes orgânicos, acetona, anilina, tetracloreto de carbono, etanol e nitrosaminas (Koop, 1992) e, conseqüentemente, esta isoforma tem papel relevante na desintoxicação ou ativação metabólica de diferentes substâncias.



**Figura IV. 5:** Contribuição de CYP no metabolismo de medicamentos.  
Fonte: Guengerich, 2006



O metabolismo tem papel fundamental na manifestação de efeitos tóxicos e na disponibilidade de uma substância. O metabolismo tem influência em fatores farmacocinéticos importantes como a meia-vida biológica, a duração da exposição, o acúmulo e a eliminação do xenobiótico do organismo. Na pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas, os fatores que podem levar a efeitos tóxicos são alvos estratégicos de investigação. Dentre esses alvos, encontram-se as alterações do comportamento farmacocinético, farmacodinâmico e da modulação de CYP (Guengerich, 2006), o que poderia alterar o metabolismo de outros xenobióticos.

Há poucos estudos sobre a interferência da exposição ao antimônio com as atividades das CYP. Em 1981, Drummond & Kappas mostraram uma inibição das atividades de anilina hidroxilase e etilmorfina desmetilase – catalisadas principalmente por CYP2E1 e CYP3A, respectivamente – em ratos Sprague-Dawley tratados por via oral com dose única (10 mg/kg de peso corpóreo) de diferentes antimoniais trivalentes. No mesmo estudo também foram observadas a diminuição da concentração de citocromo P450 total e a indução da atividade de heme oxigenase (Drummond & Kappas, 1981). O tratamento administrado por via intraperitoneal, de camundongos suíço albinos machos, com os antimoniais trivalentes Antiomalina (10mg/kg peso corpóreo) e Astiban (40 mg/kg de peso corpóreo) por três dias consecutivos, aumentou a atividade da hidroxilase arila (catalizada por CYP1A1) (Mostafa *et al.*, 1989). A exposição de ratos Sprague-Dawley a antimoniais trivalentes por via oral, adicionados à água durante 90 dias aumentou a atividade de etoxiresorufina-O-dealquilase (EROD), catalisada também por CYP1A1/2 (Poon *et al.*, 1998).

A modificação da atividade de CYP pode alterar a desintoxicação e a ativação metabólica de diversas substâncias, tais como medicamentos e contaminantes ambientais. O conhecimento das possíveis alterações da atividade de diferentes CYP, durante o tratamento com antimoniato de meglumina, é etapa crucial para a avaliação de segurança desse medicamento e na elaboração de regimes terapêuticos mais eficazes.

## ***IV. 2 Objetivos***

### ***IV.2.1 Objetivo geral***

Avaliar as alterações de atividade e expressão das citocromos P450, enzimas da fase I de biotransformação de xenobióticos, no fígado de ratos tratados durante 20 dias com diferentes doses de AM.

### ***IV.2. 2 Objetivos específicos***

- Estudar o efeito do tratamento com AM sobre a atividade das isoformas CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1, CYP3A no fígado;
- avaliar o efeito do AM sobre os níveis de proteína das isoformas CYP1A1/2 e CYP3A;
- avaliar o efeito do AM sobre os níveis de RNAm das isoformas CYP1A1, CYP1A2 e CYP2E1;
- determinar a concentração residual de Sb total no sangue e no fígado após o tratamento repetido com AM.

### ***IV.3 Materiais e métodos***

#### ***IV.3.1 Animais***

Foram utilizados ratos Wistar machos *spf* com idade entre 9-10 semanas fornecidos pelo CECAL, FIOCRUZ. Os animais foram mantidos em condições padrão de temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa (aproximadamente 70%) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Água filtrada e ração (Nuvital<sup>®</sup>, Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) foram fornecidas *ad libitum*.

#### ***IV.3.2 Tratamento com antimoniato de meglumina ou veículo***

O AM foi injetado por via subcutânea na região dorsal diariamente durante 20 dias consecutivos nas doses de 50 (n=8), 150 (n=8) ou 300 (n=12) mg  $\text{Sb}^{\text{V}}$ /kg/dia de peso corpóreo. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo (n=20), *i.e.* metabissulfito de potássio (1,6 mg/mL) e sulfito de sódio (0,18 mg/mL).

O volume do AM (ou veículo) injetado em cada animal foi ajustado de acordo com o peso corpóreo sendo as doses de AM expressas em relação à quantidade de antimônio ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ) indicada pelo fabricante do medicamento (Glucantime<sup>®</sup>) e os animais do grupo controle receberam quantidades equivalentes de veículo. Os animais foram examinados e observados diariamente para registro de sinais gerais de toxicidade.

#### ***IV.3.3 Necropsia***

Os ratos foram pesados e mortos por decapitação 24 horas após a última injeção. Os seguintes órgãos foram retirados e pesados: baço, coração, rins e fígado. O fígado foi o primeiro órgão a ser retirado, pesado, identificado e imediatamente armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Amostra de sangue e um pequeno fragmento do fígado de cada animal foram separados identificados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação de antimônio total. Outro pequeno fragmento de fígado (aproximadamente 50 mg) foi retirado, identificado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para quantificação dos níveis de RNAm em criotubos não permeáveis ao nitrogênio líquido.

#### ***IV.3.4 Digestão das amostras de sangue e fígado e quantificação de antimônio por ICP-MS (Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado)***

Essa etapa do estudo foi realizada no laboratório de ICP-MS da PUC-Rio, coordenado pelo Prof. Dr. Norbert Miekeley.

Após o descongelamento das amostras de sangue, foram adicionados 2,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado aos tubos contendo massa conhecida da amostra. Os tubos com as amostras foram colocados em chapa de aquecimento a aproximadamente 95°C por 16 horas. Ao final da digestão foram adicionados padrão interno (<sup>115</sup>In) e água desionizada (18MΩcm) até o volume final de 10 mL (diluição final: 1:10), nas amostras de animais tratados apenas com o veículo. As amostras de sangue dos animais tratados com AM foram diluídas 100 ou 1000 vezes, sendo a adição do padrão interno realizada na última etapa da diluição.

Os fragmentos de fígado foram liofilizados (Liobrás L101 e bomba de vácuo Dosivac DVR140) e cerca de 250 mg (peso seco) da amostra foram digeridas com 5 mL de HNO<sub>3</sub> subdestilado (ácido nítrico) durante 12 horas à temperatura ambiente. As amostras foram então colocadas em bloco digestor a 80°C por 3 horas. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 2,0 ml de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As amostras foram aquecidas em bloco de digestão a 70 °C por mais 10 minutos. As amostras foram então diluídas com água desionizada até completar o volume de 20 mL. Para a quantificação de antimônio, as amostras foram diluídas 400 ou 800 vezes de acordo com a concentração esperada do analito, com adição de padrão interno (<sup>115</sup>In).

A quantificação de antimônio total (Sb<sup>121</sup> e Sb<sup>123</sup>) foi realizada por ICP-MS em aparelho ELAN 5000 A (Perkin-Elmer, Sciex, USA) equipado com nebulizador Meinhard e uma câmara de nebulização ciclônica (ambos da Glass Expansion, AU).

Os valores foram corrigidos pelo fator de diluição e pela massa da amostra biológica. No cálculo do antimônio no fígado foi utilizada como referência o peso seco do órgão, *i.e.* após liofilização.

#### ***IV.3.5 Preparo de fração microsomal***

A fração microsomal hepática foi preparada a temperatura de 4°C de acordo com De-Oliveira *et al.* (1997). O fígado foi homogeneizado e centrifugado a 9000 x g por 30 minutos em tampão Tris 100 mM KCl 150 mM pH 7,4. O sobrenadante foi centrifugado duas vezes a 100.000 x g por 60 minutos. Após a segunda ultracentrifugação o sedimento obtido foi homogeneizado com tampão fosfato dibásico 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4, aliquoteado e armazenado a -70°C. Essa fração microsomal foi utilizada para a quantificação da atividade das isoenzimas do citocromo P450 e para análise semi-quantitativa da expressão de proteínas pela técnica de *immunoblotting*.

#### ***IV.3.6 Determinação da concentração de proteína***

A concentração de proteína de todas as amostras foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Foi utilizado o corante Azul de Coomassie G-250 e a leitura de densidade ótica (DO) foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro Molecular Devices ® Spectra max plus384.

As curvas de calibração foram feitas com albumina sérica bovina – BSA (Sigma-Aldrich). As amostras de preparação microsomal, assim como o padrão de albumina, foram diluídas em solução tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2. Todos os padrões e amostras foram quantificados em triplicata. Para converter a DO em concentração de proteína, foi utilizada a curva padrão com BSA. Após as correções para o fator de diluição empregado, as concentrações de proteína na fração microsomal foram calculadas a partir das médias de cada triplicata e expressas como mg de proteína/ml de preparação microsomal.

#### ***IV.3.7 Quantificação da atividade de isoenzimas citocromo P450 hepáticas***

##### ***IV.3.7.1 Determinação das atividades de resorufina-O-desalquilases***

As atividades de etoxioresorufina-*O*-desetilase (EROD) e metoxioresorufina-*O*-desmetilase (MROD), marcadoras de CYP1A1/2 e benziloxioresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) e pentoxioresorufina-*O*-despentilase (PROD), marcadoras de CYP2B1/2 foram determinadas segundo método descrito por Burke *et al.* (1985), exceto pela utilização de sistema regenerador de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) (De-Oliveira *et al.*, 1999).

As reações de *O*-desalquilação foram medidas pela fluorescência gerada pelo acúmulo de resorufina, cuja leitura foi realizada em espectrofluorímetro para leitura em microplacas (Molecular Devices ® Spectra Max Gemini XS) com excitação de 530 nm e emissão 590 nm. As curvas padrão foram construídas com diferentes quantidades de resorufina (1 µM) diluídas em tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM pH 7,8 De-Oliveira *et al.*, 2006.

A reação foi realizada em microplaca de 96 poços, sendo que cada ponto da curva e cada amostra foi analisado em triplicata. Em cada poço foi adicionado o substrato específico, *i. e.* etoxioresorufina, metoxioresorufina, benziloxioresorufina ou pentoxioresorufina, diluído a 5 µM em solução tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,8. A preparação microssomal de cada amostra foi adicionada ao poço de modo a obter 25 µg de proteína. A reação foi iniciada após a adição do sistema regenerador de NADPH (Glicose-6-fosfato 5 mM; β-NADP 0,25 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM; Glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,5 U/ml) e ocorreu a 37°C em banho-maria (Heto®) com agitação (80 movimentos/minuto) durante 10 minutos. Após a adição de acetonitrila a reação foi interrompida e a placa mantida a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos. Os valores de fluorescência obtidos foram convertidos para quantidade de resorufina produzida e expressos em picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto da reação.

#### ***IV.3.7.2 Determinação da atividade de p-nitrofenol hidroxilase***

A atividade da *p*-nitrofenol hidroxilase foi quantificada por espectrofotometria como descrito por Allis e colaboradores 1994. Essa reação já foi descrita como sendo marcadora da atividade de CYP 2E1. O produto formado da reação da enzima (4-nitrocatecol) absorve luz com 480 nm de comprimento de onda, diferente do substrato da reação (*p*-nitrofenol).

No momento da análise foi determinado o espectro de absorção do *p*-nitrofenol, em cubetas de quartzo usando uma solução de *p*-nitrofenol 0,1 mM (Allis e Robinson, 1994). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV 1601. O substrato (*p*-nitrofenol 10 mM), preparação microsomal (2 mg/ml) e solução tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM (pH 6,8) foram adicionados a cubeta de plástico. A reação foi iniciada com adição do sistema regenerador de NADPH a 37°C após 5 minutos adicionais de incubação, a atividade foi registrada, a 480 nm, durante 10 minutos. O coeficiente de extinção do 4-nitrocatecol (3,57 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) foi utilizado para o cálculo da concentração do produto formado. Os resultados foram expressos em nanomoles 4-nitrocatecol/mg proteína/minuto.

#### ***IV.3.7.3 Determinação da atividade de eritromicina-N-desmetilase (END) e N-nitrosodimetilamina-N-desmetilase (NDMA-d)***

As atividades END e NDMA-d, marcadoras, respectivamente de CYP3A2 e CYP2E1, foram quantificadas através da formação de formaldeído pelo método de Nash (1953). A reação ocorreu em tubos de polipropileno a 37°C aos quais foram adicionados a preparação microsomal (1mg/mL) diluída em tampão Tris 50 mM KCl 150 mM pH 7,4) e substrato, *i.e.* eritromicina 1 mM ou nitrosodimetilamina 0,4 mM.

Uma curva com diluições sucessivas de formaldeído foi constituída. A reação foi iniciada após a adição de sistema regenerador de NADPH (Glicose-6-fosfato 10 mM, β-NADP 0,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Glicose-6-fosfato-desidrogenase 1 U/mL). Decorridos 30 minutos de incubação a 37 °C, a reação foi interrompida com a adição de ZnSO<sub>4</sub> 25%. Após 15 minutos em banho de gelo, foi adicionada solução saturada de Ba(OH)<sub>2</sub> e as amostras foram centrifugadas a 13000 RPM durante 10 minutos e 300 µl de reagente de Nash (acetato de amônio 2 M, ácido acético 0,05 M e acetilacetona 0,02M), adicionados a 700 µl do sobrenadante. As amostras foram incubadas em banho-maria (Heto<sup>®</sup>) a 50 °C por 30 minutos. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices<sup>®</sup> Spectra max plus384) a 412 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de formaldeído/mg proteína/minuto.

#### ***I V.3.7.4 Determinação da atividade de anilina-4-hidroxilase (A4H)***

A atividade de anilina-4-hidroxilase (A4H) foi determinada pelo método de Schenkman *et al.* (1967) e baseia-se na formação de 4-aminofenol convertido a um complexo fenol-indofenol cuja absorção máxima ocorre a 630 nm.

A reação ocorreu em tubos de polipropileno a 37°C. Foram adicionados a preparação microsomal (10 mg/mL em tampão Tris 200 mM pH 7,8) a anilina 50 mM. A reação foi iniciada com a adição de sistema regenerador de NADPH (Glicose-6-fosfato 10 mM,  $\beta$ -NADP 0,5 mM, Glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,5 U/mL) e interrompida com a adição de ácido tricloroacético 20% depois de 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e, ao sobrenadante foram adicionados solução de fenol 1% e carbonato de sódio 1M. Uma curva com diluições sucessivas de padrões de 4-aminofenol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices® Spectra max plus384) a 630 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de 4-aminofenol/mg proteína/minuto.

#### ***IV.3.8 Expressão de proteína por técnica de SDS-PAGE e immunoblotting***

A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida a 8% e a transferência foi realizada em papel de nitrocelulose. Foram utilizados anticorpos policlonais anti-CYP1A1 (desenvolvido em cabra) e anti-CYP3A (desenvolvido em coelho) (**Tabela IV.2**) e secundários conjugados a fosfatase alcalina, fornecidos pela Santa Cruz Biotechnologies. Os anticorpos secundários utilizados foram: burro anti-cabra IgG (sc-2037) e burro anti-coelho IgG (sc-2319).

A corrida foi realizada em cuba de eletroforese (Hoefer mini Ve, Amersham Pharmacia Biotech) acoplada a uma fonte (EPS 301 Amersham Pharmacia Biotech) a 20mA no gel de empacotamento e, posteriormente, a 40 mA no de resolução. A transferência foi realizada durante a noite em unidade de transferência (Hoefer mini Ve, Amersham Pharmacia Biotech). Após a transferência as membranas foram lavadas em TBS e bloqueadas com solução de gelatina 3% em TBS por 90 minutos. Após novas lavagens com TTBS, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário por 90 minutos. Após novas etapas de lavagem em TTBS, ocorreu a incubação com o anticorpo secundário por 60 minutos e revelação com o substrato para fosfatase alcalina da Bio-Rad.



As membranas foram fotografadas e a densitometria das bandas quantificadas utilizando o Software Image J 1.39u (National Institutes of Health, USA).

**Tabela IV.2.** Anticorpos primários utilizados para o estudo de expressão de CYP 1A1 e CYP 3A em fígado de ratos tratados com AM.

| <b>Anticorpo primário</b> | <b>Código fabricante *</b> | <b>Peso molecular</b> | <b>Características</b>   |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------|--|
| CYP1A1                    | sc-9828                    | 56 kDa                | Desenvolvido contra peptídeo da região C-terminal de CYP1A1 murina e reconhece também CYP1A2 de camundongo, rato e humano.           |
| CYP3A                     | sc-25845                   | 55kDa                 | Desenvolvido contra os aminoácidos 204-503 da região C-terminal de CYP3A4 de origem humana e reconhece 3A camundongo, rato e humano. |

\**Santa Cruz Biotechnologies*

### ***IV.3.9 Análise de expressão gênica por real time RT-PCR***

#### ***IV.3.9.1 Extração e quantificação de RNA das amostras de fígado***

No momento da extração foi adicionado às amostras 1 mL do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen). Os fragmentos foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos elétrico (Polytron<sup>®</sup>) em banho de gelo e, posteriormente foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Tedia<sup>®</sup>). As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000G a 4°C em centrífuga refrigerada (Mikro 22R, Hettich). A fase aquosa resultante foi retirada e transferida para tubos *ependorfs* onde foram adicionados 500µL de isopropanol (Tedia<sup>®</sup>) e nova centrifugação (10 minutos, 12000g, 4°C) realizada. O sobrenadante foi descartado e 1mL de etanol (Tedia<sup>®</sup>) 75% em água desionizada tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC, Sigma) (água DEPC), adicionado. Outra centrifugação de 5 minutos a 7500g a 4°C foi realizada, o sobrenadante descartado e cada *pellet* ressuspenso em 20 µL de H<sub>2</sub>O DEPC.

O volume de 1µL foi retirado de cada amostra para a determinação da concentração de RNA total utilizando-se o espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop<sup>®</sup>). A concentração de RNA de cada amostra foi expressa em ng/µL e as amostras armazenadas a -80°C.

#### ***IV.3.9.2 Síntese de DNA complementar (DNAc)***

Na etapa de síntese de DNAc foi utilizado o kit Superscript II<sup>®</sup> (Invitrogen). Foram adicionados a tubos *ependorf*: 1µL de mistura de nucleotídeos (dNTP) (Invitrogen), 1µL de oligodT (Promega), volume de amostra contendo 3 µg de RNA e água DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 65°C em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) e foram adicionados 4µL de tampão *firststrand* 5 vezes concentrado (Invitrogen), 2µL de DTT 0,1M e 1µL de RNaseOut<sup>®</sup> (Invitrogen). Esta mistura foi incubada no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) por 2 minutos a 42°C e, posteriormente 1µL de transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen) foi adicionado. As amostras foram incubadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) por 50 minutos a 42°C e uma etapa final de

desnaturação de 15 minutos a 70 °C foi realizada. As amostras de cDNA foram armazenadas a -80°C.

#### ***IV.3.9.3 Quantificação relativa dos níveis de RNAm por real time RT-PCR***

Os níveis de RNAm das enzimas CYP1A2, 2E1 e 3A11 foram quantificados através da técnica de *real time* PCR utilizando-se a metodologia Taqman<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Nestes ensaios utiliza-se uma seqüência com aproximadamente 18 nucleotídeos, denominada sonda, que anela especificamente no DNA complementar do gene alvo. Esta sonda encontra-se conjugada a um fluoróforo que durante a etapa de extensão é clivado pela ação exonucleásica da DNA polimerase. Após a clivagem o sinal de fluorescência é emitido e pode ser detectado pelo termociclador em tempo real (*real time*) (7500 Fast – Applied Biosystems).

Para os genes-alvo foram utilizadas sondas conjugadas com o fluoróforo FAM<sup>®</sup>, para o controle endógeno  $\beta$ -actina foi utilizada sonda conjugada com o fluoróforo VIC<sup>®</sup>. Todas as sondas utilizadas neste trabalho constam do catálogo da Applied Biosystems e tem suas seqüências protegidas por patentes comerciais.

As sondas utilizadas foram:

- gene CYP 1A1 → Rn00487218 m1;
- gene CYP 1A2 → Rn00561082 m1;
- gene CYP 2E1 → Rn00580624m1;
- gene  $\beta$ -actina → 4352-340E.

Os ensaios foram realizados em placas ópticas de 96 poços (Applied Biosystems) onde foram pipetados 8  $\mu$ l de solução contendo todos os componentes necessários para a reação de PCR (Master Mix - Applied Biosystems) e 2  $\mu$ l de cDNA. A diluição de cDNA utilizada para cada sonda foi determinada através de curvas de eficiência previamente realizadas.

A validação das sondas foi feita utilizando a inclinação e o valor de  $R^2$  de curvas de amplificação com diferentes quantidades de cDNA para cada uma das sondas utilizadas. Foram utilizadas amostras de cDNA de animais controle. Os pontos da curva foram preparados através de diluição seriada de fator 5.

Os níveis de transcrição de cada gene foram analisados através da diferença de expressão entre o gene alvo e o controle endógeno de uma mesma amostra, medido

através do limiar de ciclos (*threshold cycle*) ( $\Delta Ct$ ). A expressão relativa entre os grupos de animais tratados com AM e tratados com veículo (controle) foi analisada através da diferença dos valores de  $\Delta Ct$  de cada animal tratado contra a média de  $\Delta Ct$  do grupo controle através da fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### ***IV.3.10 Análise estatística***

As variáveis que apresentaram distribuição normal (paramétrica) foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post hoc* de *Tukey*. Para as variáveis que aparentemente não apresentam distribuição normal, os resultados foram comparados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney para determinar as diferenças entre os grupos. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## ***IV.4 Resultados***

### ***IV.4.1 Alteração de peso corpóreo e pesos dos órgãos.***

Os ratos tratados com AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias não apresentaram alterações significativas de peso corpóreo (**Tabela IV.3**).

O peso absoluto do baço, a partir da menor dose, e relativo, a partir da dose de 150 mg Sb<sup>V</sup>/kg, estava aumentado cerca de duas vezes quando comparado com o peso do órgão em animais tratados apenas com o veículo. O peso relativo do baço na maior dose (300 mg Sb<sup>V</sup>/kg) também foi maior do que o peso do órgão nos ratos tratados com a dose de 50 mg Sb<sup>V</sup>/kg. O peso absoluto e relativo do coração de animais tratados com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg estava aumentado quando comparado com todos os outros grupos, *i.e.* veículo, 50 e 150 mg Sb<sup>V</sup>/kg.

O peso relativo do fígado de animais tratados com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg estava aumentado quando comparado aos outros grupos estudados.

O peso dos rins (absoluto) de animais tratados com a maior dose estava aumentado quando comparado ao peso dos rins dos animais tratados apenas com veículo. O peso relativo dos rins dos ratos tratados com a maior dose, por sua vez, estava aumentado quando comparado com o peso do órgão grupo tratado apenas com veículo no grupo tratado e com a menor dose.

Os resultados indicam, portanto, que o tratamento com o AM durante 20 dias aumentou os pesos do baço, do coração, do fígado e dos rins.

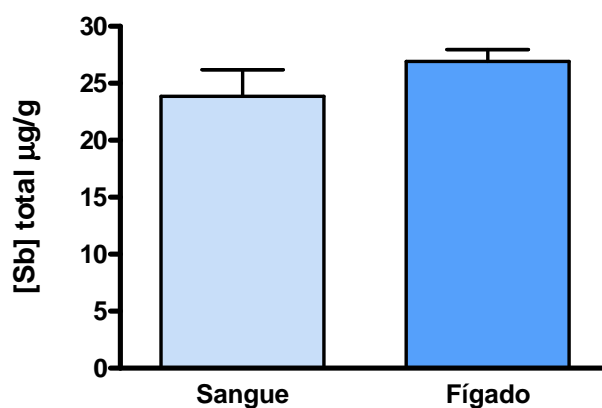
**Tabela IV. 3:** Peso corpóreo (g) e pesos absolutos (g) e relativos (%) dos órgãos de ratos machos tratados com veículo, 50, 150 ou 300 mgSb<sup>V</sup>/kg/dia durante 20 dias por via subcutânea.

|                      | <b>Veículo</b> | <b>AM 50</b>           | <b>AM 150</b>             | <b>AM 300</b>                |
|----------------------|----------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <b>Baço (g)</b>      | 0,85±0,10      | 0,98±0,14 <sup>a</sup> | 1,04±0,18 <sup>a</sup>    | 1,67±0,45 <sup>a</sup>       |
| <b>Baço (%)</b>      | 0,25±0,02      | 0,29±0,02              | 0,33±0,03 <sup>a</sup>    | 0,52±0,13 <sup>a, b</sup>    |
| <b>Coração (g)</b>   | 1,12±0,10      | 1,18±0,13              | 1,09±0,09                 | 1,58±0,17 <sup>a, b, c</sup> |
| <b>Coração (%)</b>   | 0,34±0,03      | 0,35±0,02              | 0,34±0,02                 | 0,49±0,06 <sup>a, b, c</sup> |
| <b>Fígado (g)</b>    | 11,75±1,48     | 11,52±1,42             | 10,93±1,01                | 12,37±0,92                   |
| <b>Fígado (%)</b>    | 3,51±0,16      | 3,42±0,12              | 3,44±0,11                 | 3,88±0,28 <sup>a, b, c</sup> |
| <b>Pulmões (g)</b>   | 1,57±0,30      | 1,71±0,43              | 1,09±0,09 <sup>a, c</sup> | ND                           |
| <b>Pulmões (%)</b>   | 0,50±0,09      | 0,50±0,09              | 0,34±0,02                 | ND                           |
| <b>Rins (g)</b>      | 2,52±0,32      | 2,48±0,36              | 2,49±0,53                 | 3,18±0,22 <sup>a</sup>       |
| <b>Rins (%)</b>      | 0,75±0,07      | 0,74±0,04              | 0,78±0,14                 | 0,92±0,08 <sup>a, b</sup>    |
| <b>PESO CORPÓREO</b> | 334,72±36,08   | 337,13±42,43           | 317,75±22,22              | 318,83±18,30                 |

Valores: Média±DP; Análise estatística: Peso absoluto e corpóreo: ANOVA seguido do teste post hoc Tukey; peso relativo: Kruskal Wallis e Mann Whitney. Diferenças p<0,05 <sup>a</sup> ≠veículo <sup>b</sup> ≠AM 50 <sup>c</sup> ≠AM 150

#### IV.4.2 Concentração de antimônio total no sangue e no fígado

A concentração residual (24 horas após a última dose) de antimônio no sangue de ratos tratados com AM (300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia por 20 dias) foi 23,9±7,4 µg/g (média±DP), enquanto que no fígado a concentração foi 26,9±3,1 µg/g (**Figura IV. 6**).



**Figura IV.6:** Concentração de antimônio em sangue total e fígado em ratos Wistar tratados com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose.

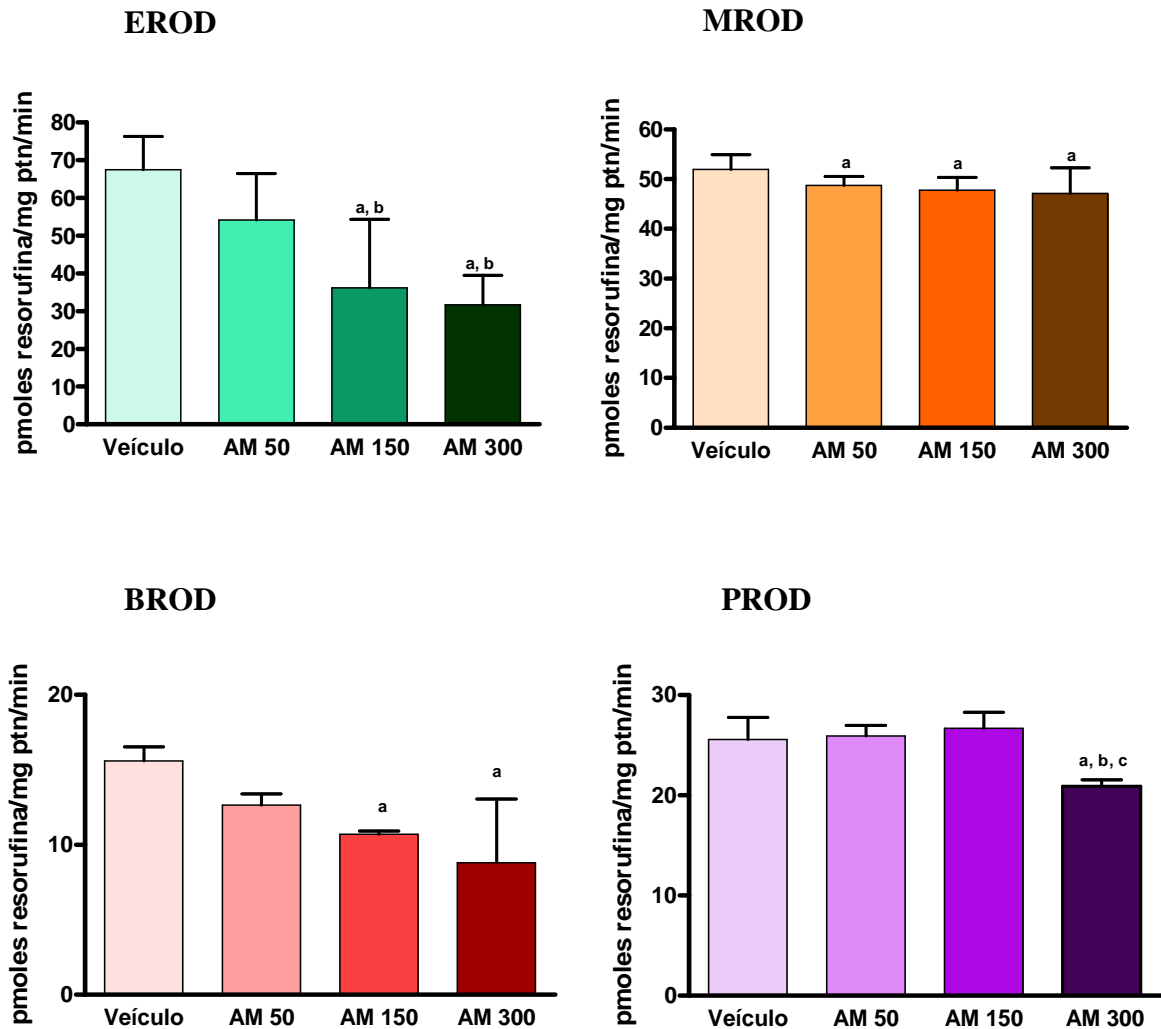
#### ***IV.4.3 Atividade de isoformas de CYP hepáticas***

A atividade de EROD estava deprimida no fígado de ratos tratados com doses repetidas de AM (150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias. Os percentuais de inibição de EROD nessas doses, em relação ao veículo foram 46% e 52% respectivamente (**Figura IV. 7a**).

A atividade de MROD (6 a 9%) nos grupos tratados com doses repetidas de AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) estava discretamente diminuída, quando comparada com a atividade no grupo tratado apenas com o veículo (**Figura IV. 7b**).

O tratamento por 20 dias inibiu significativamente as atividades de BROD nos grupos tratados com as doses de 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg de AM, em 33% e 40%, respectivamente (**Figura IV. 7c**). A atividade de pentoxiresorufina-O-desalquilase (PROD) estava inibida (19%) apenas no grupo tratado com a maior dose de AM (300 mg Sb<sup>V</sup>/kg) (**Figura IV. 7d**).

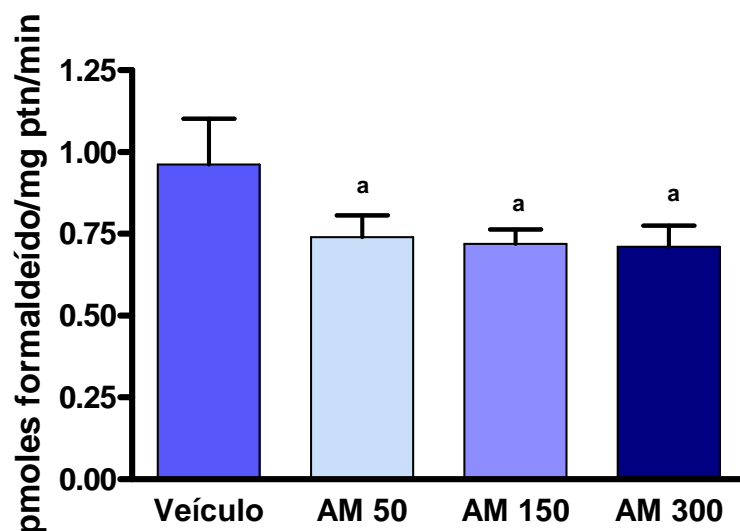




**Figura IV.7:** Atividade de etoxiresorufina-*O*-desalquilase (EROD), metoxiresorufina-*O*-desalquilase (MROD), benziloxiresorufina-*O*-desalquilase (BROD) e pentoxiresorufina-*O*-desalquilase (PROD) em fígados de ratos Wistar tratados por via subcutânea com o veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias e sacrificados 24 horas após a última dose.

Valores: média ±DP; diferenças (p<0,05) detectadas por Anova seguida do teste *post hoc*

Tukey: a≠veículo; b≠50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c≠150 mg Sb<sup>V</sup>/kg.



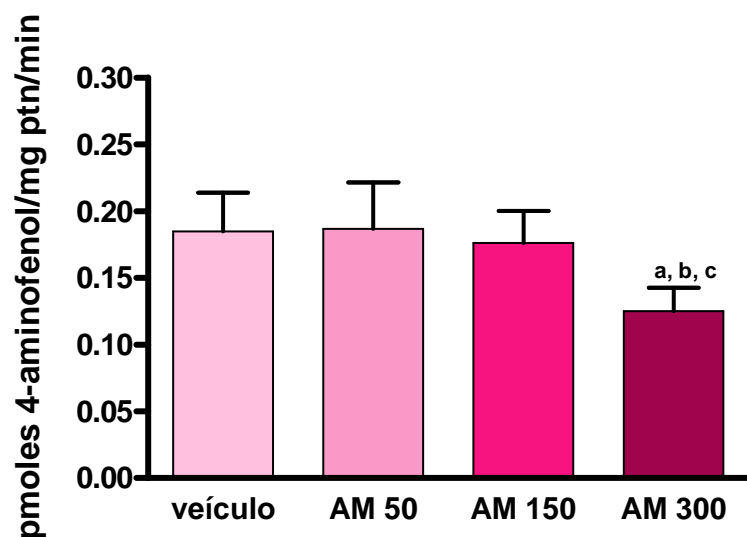
**Figura IV.8:** Atividade de eritromicina *N*-desmetilase em fígados de ratos Wistar tratados com veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose. Valores: média ±DP; diferenças (p<0,05) detectadas por Anova seguida do teste *post hoc* Tukey: a≠veículo; b≠50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c≠150 mg Sb<sup>V</sup>/kg.

O tratamento com AM deprimiu a atividade de END em todas as doses (*i. e.* 50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) (**Figura IV.8**). Os percentuais de inibição foram de 23%, 25% e 26%, respectivamente.

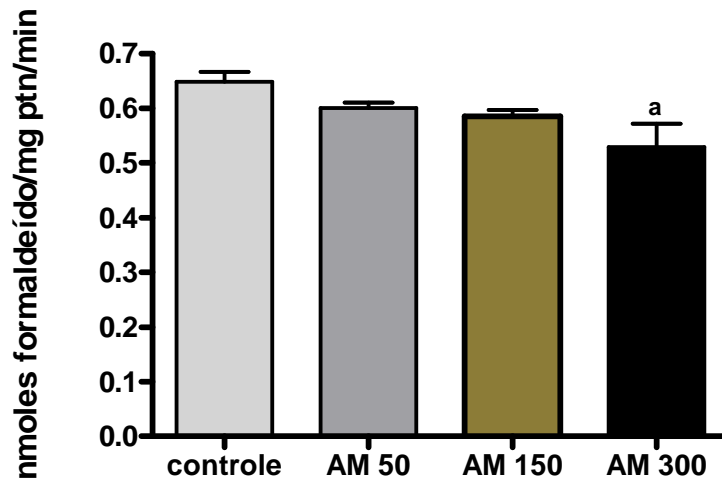
A A4H estava inibida no grupo tratado com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia quando comparado com todos os outros grupos, *i.e.* veículo, 50 e 150 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de AM (**Figura IV.9**). A inibição observada no grupo tratado com a maior dose, em relação ao tratado apenas com o veículo, foi de 33%.

A atividade de N-nitrosodimetilamina desmetilase estava diminuída no grupo tratado com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia, quando comparado com o grupo tratado apenas com veículo (**Figura IV.10**).

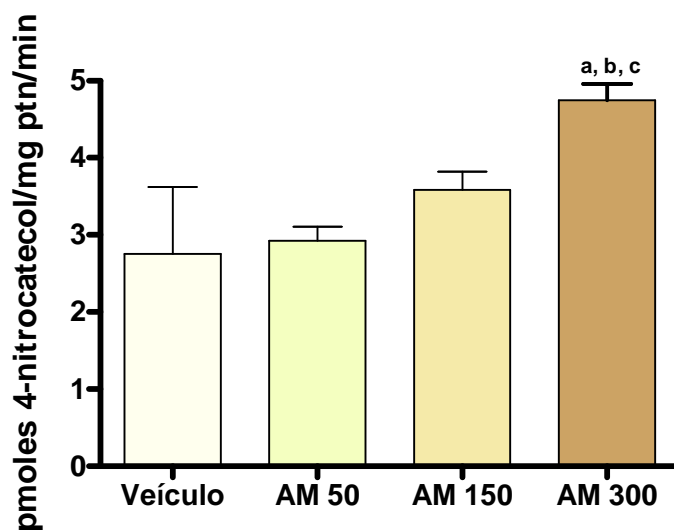
O grupo tratado com a maior dose de AM (300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) teve a atividade de *p*-nitrofenol hidroxilase aumentada, quando comparado com todos os outros grupos, *i.e.* veículo, 50, 150 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de AM (**Figura IV.11**). A indução foi de 68% quando comparada ao grupo tratado apenas com veículo.



**Figura IV.9:** Atividade de anilina 4-hidroxilase em fígados de ratos Wistar tratados com veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose. Valores: média  $\pm$ DP; diferenças ( $p < 0,05$ ) detectadas por Anova seguida do teste *post hoc* Tukey: a $\neq$ veículo; b $\neq$ 50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c $\neq$ 150 mg Sb<sup>V</sup>/kg.



**Figura IV.10:** Atividade de *N*-nitrosodimetilana desmetilase em fígados de ratos Wistar tratados com veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose. Valores: média ±DP; diferenças ( $p < 0,05$ ) detectadas por Anova seguida do teste *post hoc* Tukey: a≠veículo; b≠50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c≠150 mg Sb<sup>V</sup>/kg.

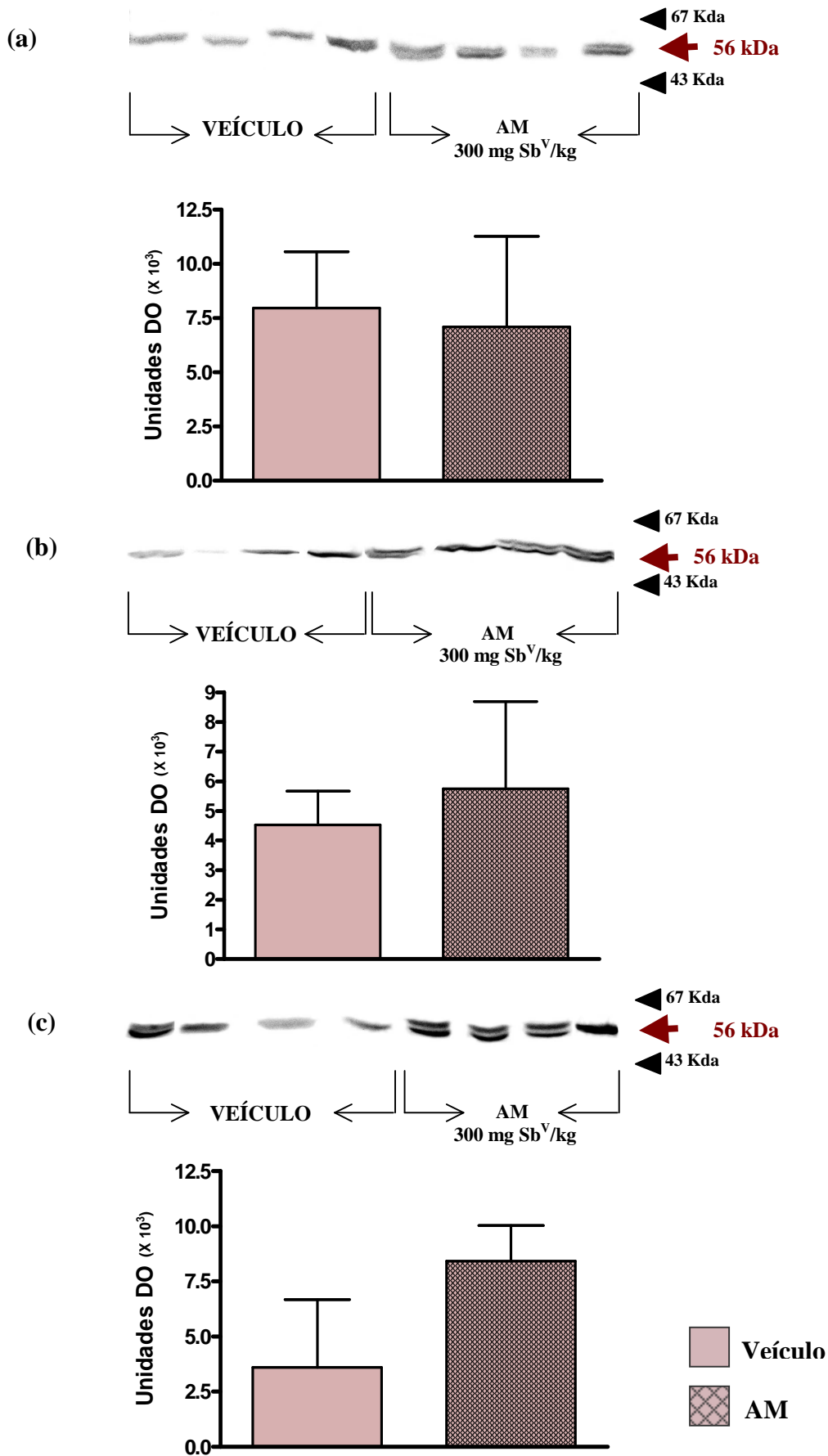


**Figura IV.11:** Atividade de p-nitrofenol hidroxilase em fígados de ratos Wistar tratados com veículo ou AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea e sacrificados 24 horas após a última dose. Valores: média ±DP; diferenças (p<0,05) detectadas por Anova seguida do teste *post hoc* Tukey: a≠veículo; b≠50 mg Sb<sup>V</sup>/kg; c≠150 mg Sb<sup>V</sup>/kg.

#### ***IV.4.4 Expressão de CYP hepáticas pela técnica de immunoblotting***

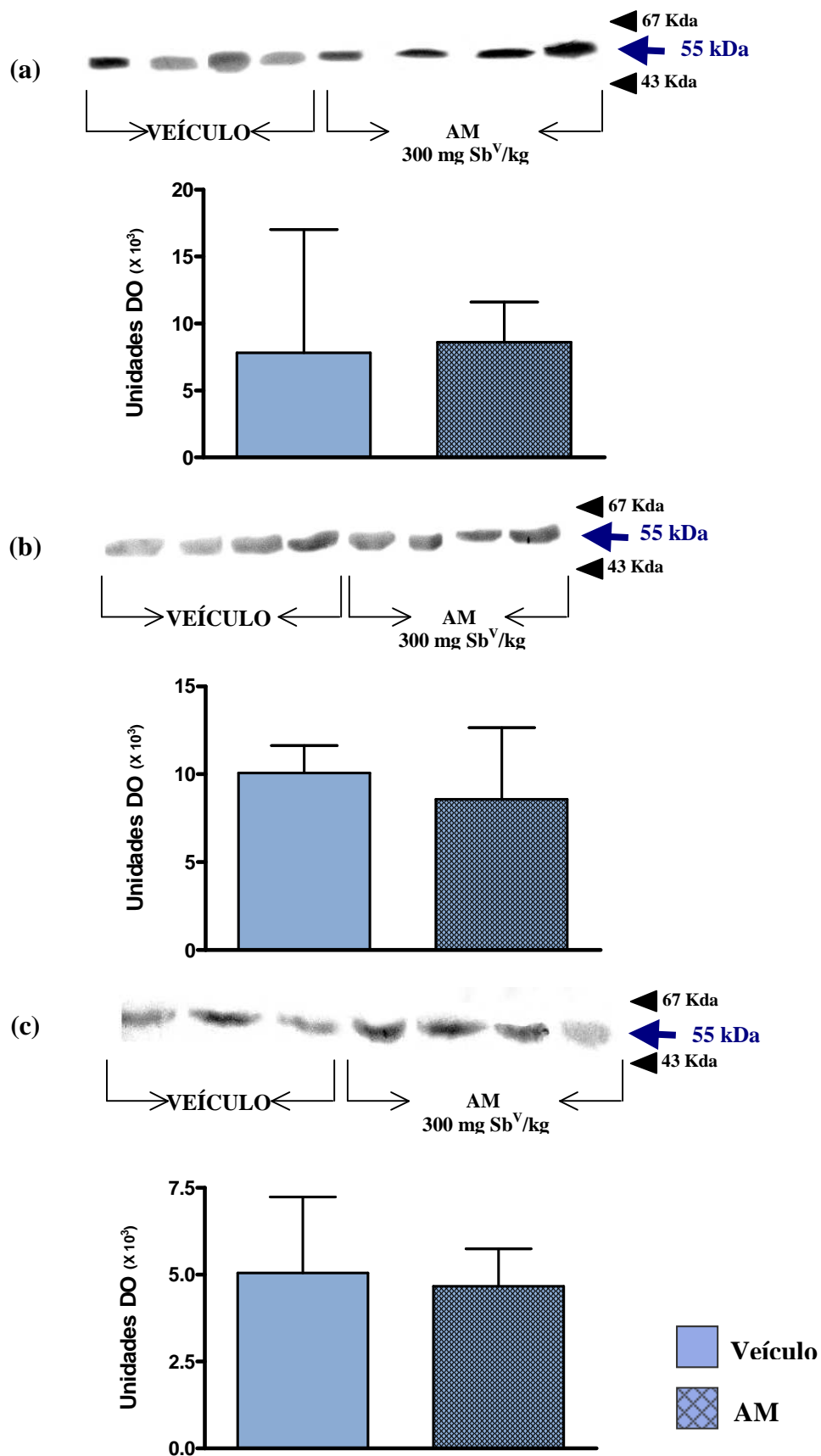
Em cada gel de eletroforese foram colocadas amostras de diferentes animais tratados com veículo apenas ou com AM. As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo primário anti-CYP1A ou anti-CYP 3A. Nas figuras **Figura IV. 12 e Figura IV. 13** são mostrados os resultados de três diferentes membranas (a), (b) e (c).

Os níveis de proteína das isoformas CYP1A1/2 (**Figura IV. 12**) e CYP3A (**Figura IV.13**), separadas por eletroforese e analisadas pela técnica de *immunoblotting*, não diferiram entre animais tratados apenas com veículo e aqueles tratados com 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia. Os níveis de proteínas foram determinados após a medição da densidade de cada banda, calculada através da análise de pixels pela área.



**Figura IV. 12** Níveis de proteínas de isoformas CYP1A (expressos em unidades arbitrárias de Densidade Óptica (DO)) de ratos tratados por 20 dias com veículo e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de AM. Os painéis (a), (b) e (c) referem-se a diferentes animais (n=12/grupo)





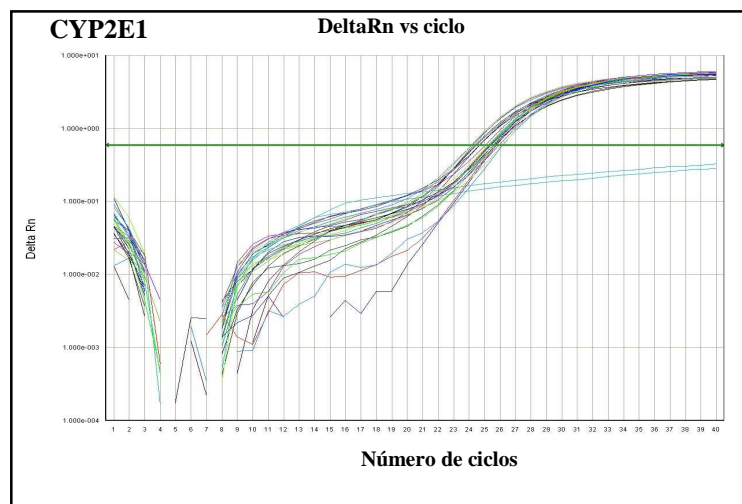
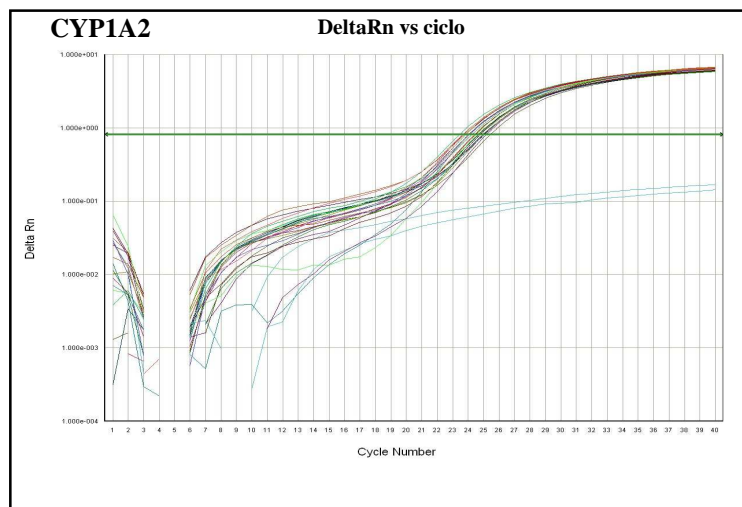
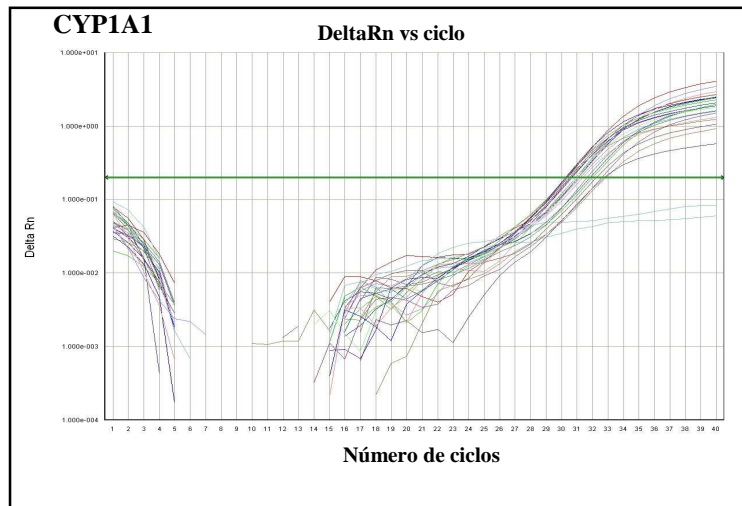
**Figura IV. 13** Níveis de proteínas de isoformas CYP3A (expressos em unidades arbitrárias de Densidade Óptica (DO)) de ratos tratados por 20 dias com veículo e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de AM. Os painéis (a), (b) e (c) referem-se à diferentes ratos (n=12/grupo).

#### ***IV.4.5 Quantificação dos níveis de RNAm de CYP***

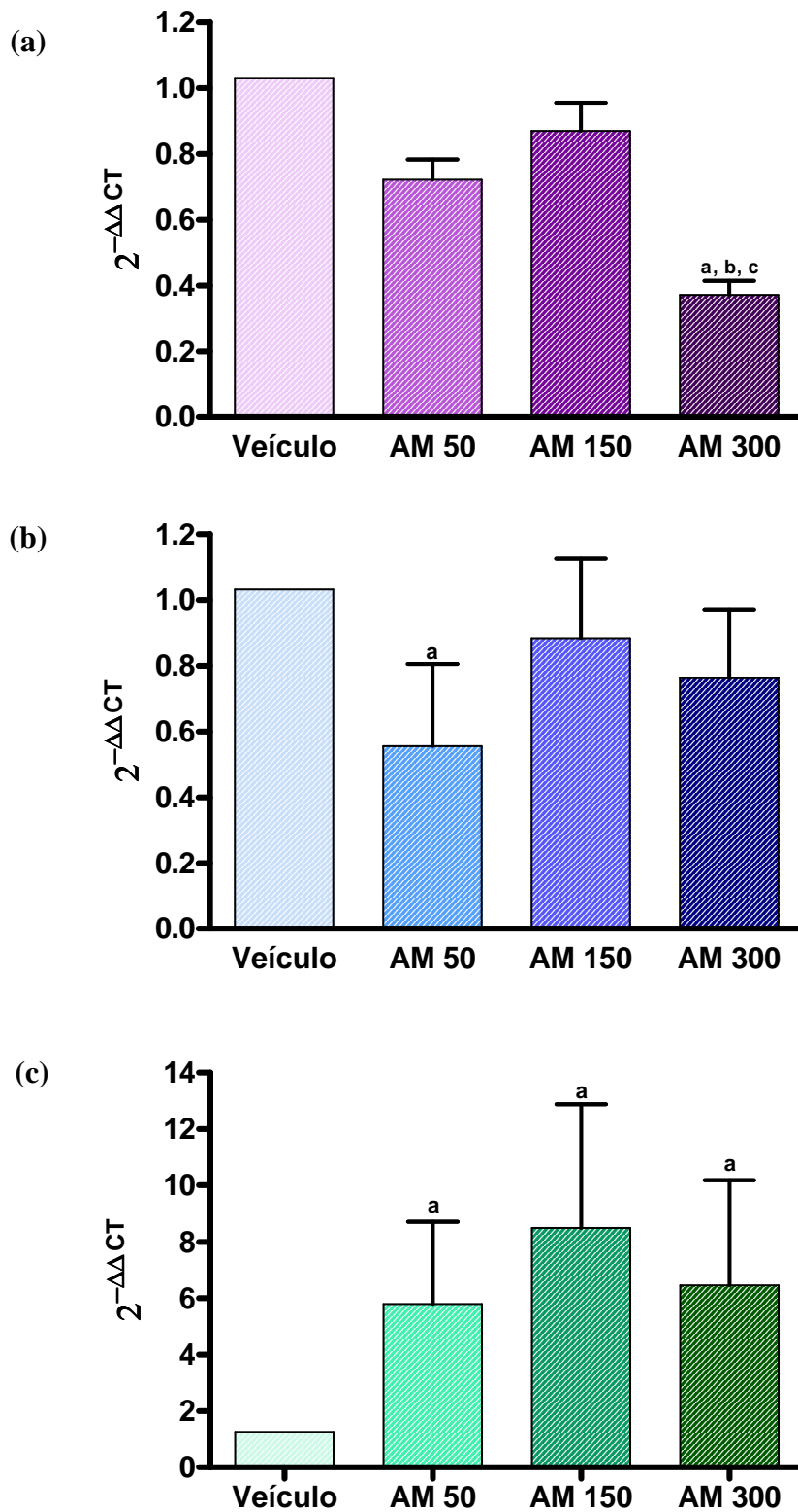
A **Figura IV. 14** ilustra o número de ciclos necessário para atingir um limiar de fluorescência determinado. Esses resultados indicam que a isoforma expressa em maior quantidade no fígado de ratos é a CYP1A2 dentre as isoformas estudadas.

Os níveis de RNAm da CYP1A2 estavam diminuídos ( $p < 0,05$ ) apenas na menor dose de AM (50 mgSb<sup>V</sup>/kg/dia) (**Figura IV. 15 (a)**). Os níveis de RNAm da CYP2E1 nos ratos que receberam a maior dose de AM (300 mgSb<sup>V</sup>/kg/dia) estavam diminuídos quando comparados com todos os outros grupos tratados com AM, *i.e.* 50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia (**Figura (b)**).

Os níveis de RNAm da CYP 1A1, entretanto, estavam aumentados cerca de 5 a 7 vezes, em todas as doses *i.e.* 50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia (**Figura IV. 15 (c)**).



**Figura IV.14:** Curvas de amplificação das sondas de CYP 1A1, 1A2 e 2E1 (fluorescência *versus* nº de ciclos) utilizando o sistema *Taqman*.



**Figura IV.15:** Quantificação relativa de RNAm de CYP 2E1 (a), CYP 1A2 (b) e CYP

1A1 (c) no fígado de ratos tratados com antimoniato de meglumina por 20 dias.

#### IV.5 Discussão

As alterações de peso do fígado, baço, rins e coração, em ratos tratados com AM sugerem que esses são órgãos alvo do tratamento com os antimoniais pentavalentes. Efeitos nefrotóxicos, cardiotoxicos e hepatotóxicos foram descritos em seres humanos (Veiga *et al.*, 1983; Sampaio *et al.*, 1997; Chulay *et al.*, 1988) e em ratos (AlKhawajah *et al.*, 1992; Poon *et al.*, 1998). É possível que a espécie de antimônio acumulada seja a trivalente, que pode resultar, em grande parte, da biorredução do antimônio pentavalente.

A análise dos níveis de antimônio total no fígado e no sangue, 24 horas após a administração da última de uma série de 20 doses diárias, indica que as concentrações de antimônio residual (componente lento de eliminação) são, neste momento, semelhantes nas duas matrizes. Na primeira parte deste trabalho, entretanto, havíamos mostrado que, em primatas não humanos, os níveis de antimônio total no fígado, 60 dias após a última dose diária de uma série de 21, estavam mais elevados do que os níveis no plasma. Esses dados preliminares em primatas não humanos (Rhesus) sugerem que o fígado é um órgão de depósito do antimônio residual que, cessada a exposição, seria mobilizado muito lentamente para a corrente sanguínea. É possível que o mesmo ocorra em ratos.

A atividade e expressão das CYP podem ser alteradas em diversos estados patológicos, tais como diabetes (Yamazoe *et al.*, 1989) e infecções parasitárias e virais (De-Oliveira *et al.*, 2006; Sheweita *et al.*, 2002; Coombs *et al.*, 1990; Kirby *et al.*, 1994) e também em decorrência da exposição a xenobióticos, como poluentes (Bell *et al.*, 2007; Edwards *et al.*, 2007), agrotóxicos (Oropeza-Hernandez *et al.*, 2003) e metais (Tully *et al.*, 2000; Vakharia *et al.*, 2001; Nebbia *et al.*, 1997).

Neste estudo foram avaliadas as atividades marcadoras de diferentes isoformas de CYP de ratos tais como: EROD/MROD (CYP1A1/2), BROD/PROD (CYP2B1/2), END (CYP3A) e NDMA/A4H (CYP2E1). Os ratos machos tratados com AM apresentaram diminuição das atividades EROD, BROD, PROD, MROD, END, NDMA e A4H, de maneira dose-dependente (**Tabela IV. 3**). Entretanto, a atividade de PNPB, que é descrita como sendo marcadora de CYP2E1 estava aumentada.

As isoformas de CYP apresentam sobreposição de especificidades de substratos (**Tabela IV. 1**). Por exemplo, a atividade de A4H, é mediada por CYP2E1, mas também é catalisada pela CYP1A2 em microsomas humanos (Kobayashi *et al.*, 2003). A especificidade da atividade de PNPB pela CYP2E1 foi determinada

inicialmente, a partir do aumento de 4-nitrocatecol após o tratamento de ratos (Dicker *et al.*, 1990) e coelhos (Koop, 1986) com etanol, indutor clássico desta isoforma.

**Tabela IV.4:** Alteração das atividades catalíticas de CYP no fígado de ratos tratados com AM (50, 150 e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia) durante 20 dias por via subcutânea.

| Atividade | AM 50<br>(% alteração) | AM 150<br>(% alteração) | AM 300<br>(% alteração) |
|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| EROD      | NS                     | ↓ (46)                  | ↓ (54)                  |
| MROD      | ↓ (6)                  | ↓ (7)                   | ↓ (9)                   |
| BROD      | NS                     | ↓ (33)                  | ↓ (40)                  |
| PROD      | NS                     | NS                      | ↓ (19)                  |
| NDMA      | NS                     | NS                      | ↓ (20)                  |
| A4H       | NS                     | NS                      | ↓ (33)                  |
| PNPH      | NS                     | NS                      | ↑ (68%)                 |
| END       | ↓ (23)                 | ↓ (25)                  | ↓ (26)                  |

NS – não significativo. Diferenças ( $p < 0,05$ ) detectadas por Anova seguida do teste post hoc *Tukey*.

Por outro lado, outras isoformas CYP também parecem ser capazes de catalisar a hidroxilação do *p*-nitrofenol, formando 4-nitrocatecol (Zerilli *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 2003). Ratos tratados com dexametasona, indutor de CYP 3A1, apresentaram aumento da atividade hepática de PNP sem, no entanto, apresentarem diferenças de expressão de CYP2E1 (Zerilli *et al.*, 1997). No mesmo estudo, a incubação com anticorpos anti-CYP2E1 e anti-CYP3A inibiu a atividade de PNP em 92%, sugerindo que outras isoformas também poderiam contribuir em menor grau para essa reação. A hidroxilação de PNP pelas CYP2E1, 1A2 e 3A1 de ratos foi confirmada em outro estudo realizado por Kobayashi *et al.* (2003). Em microsomo hepático humano, além da CYP2E1, as CYP3A4 (Zerilli *et al.*, 1997), 2A6 e 2C19 (Monostory *et al.*, 2004) também parecem estar envolvidas na hidroxilação de PNP.

Os resultados da quantificação dos níveis de RNAm mostraram que, dentre as isoformas estudadas, a CYP1A1 é a menos expressa no fígado dos ratos do grupo controle. Os níveis de RNAm de CYP1A2 e CYP2E1 estavam diminuídos após o tratamento com AM. Entretanto, os níveis de RNAm de CYP1A1 estavam aumentados de 5 a 7 vezes em todos os grupos tratados com AM (Tabela IV.5).

**Tabela IV.5:** Alteração dos níveis de RNAm e a proteína de CYP em fígados de ratos tratados com 50 (AM 50), 150 (AM 150) e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia por via subcutânea (AM 300) durante 20 dias.

| CYP   | Atividades<br>marcadoras | Níveis de RNAm |          |          | Expressão de<br>proteína |
|-------|--------------------------|----------------|----------|----------|--------------------------|
|       |                          | AM 50          | AM 150   | AM 300   |                          |
| 1A1   | EROD, MROD               | ↑ (5x)         | ↑ (7,6x) | ↑ (5,2x) | →                        |
| 1A2   | EROD, MROD               | ↓ (0,5x)       | NS       | NS       | →                        |
| 2B1/2 | BROD, PROD               | ND             | ND       | ND       | ND                       |
| 2E1   | NDMA, A4H                | NS             | NS       | ↓ (0,3x) | ND                       |
| 3A    | END                      | ND             | ND       | ND       | →                        |

NS – não significativo; ND – não determinado; ↓ - diminuição; ↑ - aumento; → - sem alteração.

A exposição *in vitro* ao arsenito, cádmio e cromo aumentou os níveis de RNAm de CYP1A1 mas diminuiu a atividade de enzimas da subfamília CYP1A (Elbekai & El-Kadi, 2004). A transcrição de CYP1A1 também foi induzida *in vitro*, mas os níveis de CYP total e a atividade de testosterona hidroxilase estavam diminuídos em ratos expostos ao cádmio (Vincent *et al.*, 1997). Esses resultados sugerem que a inibição da atividade de CYP1A1 durante a exposição a metais é provocada ao nível pós-transcricional. Outra explicação é que os metais alteram os níveis de RNAm através da estabilização dos transcritos (Elbekai & El-Kadi, 2004; Song *et al.*, 1987). A produção de ROS por metais como arsênio, cádmio e chumbo (Pourahmad *et al.*, 2003) pode diminuir a atividade catalítica de CYP1A1/2, sem diminuir a quantidade de proteína (El-Kadi *et al.*, 2000). A indução dos níveis de RNAm durante a exposição a metais pode ocorrer através da produção de ligantes do receptor hidrocarboneto arila (AhR) durante a degradação de componentes celulares (Tchounwou *et al.*, 2001). O AhR é um fator de transcrição citosólico ativado por ligante que modula a ativação transcricional de diversos genes, incluindo *CYP1A1* e *CYP1A2* (Hankinson, 1995). A indução de CYP 1A1 (Anandatheerthavarada *et al.*, 1997) após o tratamento com  $\beta$ -naftoflavona, agonista de AhR, levou ao acúmulo de CYP1A1 na mitocôndria e em microsomas de fígado de ratos. O produto do aumento da transcrição de CYP1A1 pode ser direcionado para a mitocôndria durante estados de estresse oxidativo (Genter *et al.*, 2006). Nesse caso, os níveis de RNAm podem estar elevados e a atividade microsomal, inalterada ou até, diminuída.

Os resultados relativos aos níveis de RNAm, à expressão de proteína e às atividades indicam que o mecanismo de inibição das CYP examinadas, após o tratamento com AM, muito provavelmente é pós-traducional, uma vez que somente a atividade apresentou diferenças significativas. A diminuição das atividades, observada durante o tratamento com AM, poderia ser explicada pela degradação do heme decorrente da ativação da heme oxigenase (HO) hepática, como observado em Drummond & Kappas (1981).

A atividade de HO pode inibir diferentes isoformas de CYP (Spink *et al.*, 2002; Kaminsky, 2006; Gong *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2007). Existem duas isoformas de HO, HO-1 expressa constitutivamente no baço, fígado, rins e medula óssea e HO-2, cuja expressão pode ser induzida no cérebro, testículo e sistema vascular (Kikuchi *et al.*, 2005). A HO é responsável pelo catabolismo do heme microsomal (Kikuchi *et al.*, 2005), formando biliverdina, monóxido de carbono e ferro. A



biliverdina é convertida em bilirrubina pela enzima biliverdina redutase (Maines, 1988; Shibahara, 1988). A HO funciona como sistema de defesa contra estresse oxidativo, uma vez que a biliverdina e bilirrubina são antioxidantes (Stocker *et al.*, 1987; Poss & Tonegawa, 1997; Otterbein *et al.*, 2000; Baranano *et al.*, 2002). O sistema microsomal da HO envolve também a enzima NPR, responsável pela redução do complexo férrico heme-HO, no início do processo de degradação do heme (Yoshida & Kikuchi, 1978), mesma função exercida no ciclo catalítico das CYP (**Figura IV.3**).

A indução de HO-1 no fígado pode ser causada pela administração de hemina, hemoglobina (Shihabara *et al.*, 1978; Shihabara *et al.*, 1979), endotoxina, bromobenzeno, hormônios (Kikuchi, 1983) e íons metálicos como o cádmio (Suzuki *et al.*, 2003; Alam *et al.*, 1994), o arsenito (Spink *et al.*, 2002; Jacobs *et al.*, 1998; Keyse & Tyrrell, 1989) e o antimônio (Drummond & Kappas, 1981). A exposição a metais aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, nesse caso, a indução de HO-1 seria um mecanismo importante de defesa celular (Abu-Bakar *et al.*, 2005). Além do aumento da produção de ROS, o cádmio e o antimônio também interferem com outras enzimas antioxidantes, como a superóxido desmutase, a glutatona peroxidase e a catalase (Minami *et al.*, 1982; Ossola & Tomaro, 1995; Wang *et al.*, 1998; Schaumlöffel & Gebel, 1998).

Drummond & Kappas (1981) mostraram a indução da atividade de HO hepática e renal em ratos *Sprague Dawley* tratados com uma única dose, por via subcutânea, de antimônio trivalente (tricloreto de antimônio, tártaro emético, Astiban) e pentavalente (pentacloro de antimônio e Pentostam). Após o tratamento com os antimoniais trivalentes, foi observado o aumento da HO-1, a diminuição do heme microsomal, do CYP total e das atividades da etilmorfina desmetilase e da anilina hidroxilase. A indução de HO-1 e a diminuição do CYP total também foram observadas em estudo *in vitro* com miócitos cardíacos de ratos (Snawder *et al.*, 1999).

A indução de HO provavelmente é causada pela exposição ao antimônio trivalente, como mostrado por Drummond & Kappas (1981). Isto não exclui, todavia, a participação do antimoniato de meglumina no mesmo processo, haja visto que em seres humanos (Miekeley *et al.*, 2002), ocorre a biorredução *in vivo* do antimônio pentavalente para a forma trivalente. Sendo assim, é muito provável que o tratamento de ratos com AM produza a espécie de antimônio responsável pela indução de HO-1.

A indução de HO aumenta a degradação do heme e leva à diminuição da reserva de heme celular (Keyse & Tyrrel, 2000), acarretando a diminuição das atividades das CYP.

Tendo em vista a possibilidade de extrapolação dos resultados para seres humanos é importante considerar as diferenças de expressão e catálise das CYP em ratos e no homem.

A CYP1A1 é altamente conservada em diferentes espécies de animais como ratos, coelhos e camundongos. A CYP1A1 de ratos e seres humanos apresenta 79% de semelhanças entre suas seqüências de aminoácidos (Grimm *et al.*, 1994). Ambas podem catalisar EROD (Burke & Mayer, 1975; Burke *et al.*, 1985), mas apresentam algumas diferenças como a oxidação de benzo[a]pireno (Bauer *et al.*, 1995) e de warfarina (Kaminsky *et al.*, 1984).

As seqüências de aminoácidos das CYP1A2 de ratos e seres humanos são semelhantes em 75% (Jaiswal *et al.*, 1987) mas apresentam pequenas diferenças catalíticas em relação à MROD (Guengerich, 1997), e quase nenhuma na N-hidroxilação de aminas heterocíclicas (Yamazoe *et al.*, 1984).

As isoformas da subfamília 2A em geral, apresentam estruturas primárias parecidas, mas a atividade difere consideravelmente entre espécies (Guengerich, 1997).

As CYP2B1 possuem 76% de identificação com a CYP2B6, única isoforma desta subfamília expressa no fígado humano, e, ainda assim, em quantidades muito pequenas (Mimura *et al.*, 1993).

A semelhança entre as CYP2E1 de coelhos, ratos, e seres humanos é de aproximadamente 80% (Gonzalez, 1986). A atividade catalítica desta isoforma é muito conservada entre as espécies. A CYP 2E1 está envolvida na oxidação do álcool etílico, das nitrosaminas, de solventes e de ácidos graxos (Guengerich *et al.*, 1991; Clarke *et al.*, 1994).

Em seres humanos foram identificadas as CYP3A4, 3A5 e 3A7 (Komori *et al.*, 1990) e, no rato, as CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18 e 3A23 (Nagata *et al.*, 1990; Mahnke *et al.*, 1997). Não existem, entretanto, informações sobre as eventuais diferenças catalíticas entre as duas espécies.

As diferenças de seletividade entre as CYP humanas e seus respectivos ortólogos em ratos podem ocorrer devido a diferenças entre os sítios ativos intraespécies; reações metabólicas catalisadas pela isoforma; diferenças de sítios inibitórios (Kobayashi *et al.*, 2003).

As alterações das atividades de CYP durante a leishmaniose e o tratamento devem ser avaliadas com especial atenção. Poucos estudos avaliaram o papel da infecção na modulação das CYP. Foi mostrado que camundongos BALB/c infectados com *Leishmania donovani* apresentaram redução dos níveis hepáticos de CYP total,

citocromo b5 e NPR. Além disso, as atividades aminopirina desmetilase, anilina hidroxilase, benzfetamina desmetilase, etoxicumarina desmetilase e NDMA estavam diminuídas (Coombs *et al.*, 1990). A aminopirina desmetilase e a anilina hidroxilase também estavam diminuídas em hamsters infectados com *L. donovani* (Singh *et al.*, 1989).

Outro aspecto importante é que as alterações das atividades das CYP observadas no presente estudo podem ter impacto nos parâmetros farmacocinéticos de medicamentos. É sabido que uma grande proporção dos efeitos adversos resultam da interação entre medicamentos e de alterações do metabolismo mediado pelas CYP (Gibson & Skett, 1994). Além disso, a modulação das CYP pode causar também alterações funcionais no metabolismo do álcool (Yao *et al.*, 2007), tetracloreto de carbono (Nakahira *et al.*, 2003) e HPAs (Kaminsky, 2006).

#### *IV. 6 Conclusões*

- O tratamento de ratos com AM durante 20 dias diminuiu a atividade de EROD (CYP1A1), BROD e PROD (2B1/2), END (3A2), NDMA e A4H (2E1) e, em menor grau, de MROD (CYP1A1/2).
- A diminuição das atividades de NDMA e A4H contrasta com o aumento de PNPB e sugerem que esta última não estaria traduzindo a atividade de CYP2E1 no modelo estudado. Outra isoforma não avaliada no estudo, poderia estar induzida e ser a responsável por essa atividade aumentada.
- A expressão de proteína das isoformas CYP1A e 3A não apresentou diferenças significativas.
- Os níveis de RNAm das CYP 2E1 e 1A2 estavam diminuídos nas doses de 50 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia e 300 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia, respectivamente. Os níveis do RNAm de CYP1A1 estavam aumentados.
- Os resultados sugerem que a inibição das atividades das isoformas de CYP avaliadas provavelmente ocorre a nível pós-traducional.

## **CAPÍTULO V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abu-Bakar A, Moore MR, Lang MA. Evidence for induced microsomal bilirubin degradation by cytochrome P450 2A5. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(10):1527-35.

al Jaser M, el-Yazigi A, Kojan M, Croft SL. Skin uptake, distribution, and elimination of antimony following administration of sodium stibogluconate to patients with cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(2):516-9.

Alam J. Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals. *J Biol Chem.* 1994;269(40):25049-56.

alKhawajah A, Larbi EB, Jain S, al-Gindan Y, Abahussain A. Subacute toxicity of pentavalent antimony compounds in rats. *Hum Exp Toxicol.* 1992;11(4):283-8.

Allis JW, Robinson BL. A kinetic assay for p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes. *Anal Biochem.* 1994;219(1):49-52.

Anabwani GM, Ngira JA, Dimiti G, Bryceson AD. Comparison of two dosage schedules of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Lancet.* 1983;1(8318):210-3.

Anandatheerthavarada HK, Addya S, Dwivedi RS, Biswas G, Mullick J, Avadhani NG. Localization of multiple forms of inducible cytochromes P450 in rat liver mitochondria: immunological characteristics and patterns of xenobiotic substrate metabolism. *Arch Biochem Biophys.* 1997;339(1):136-50.

Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology.* 2006;227(3):185-92.

Antonio MT, Benito MJ, Leret ML, Corpas I. Gestational administration of cadmium alters the neurotransmitter levels in newborn rat brains. *J Appl Toxicol.* 1998;18(2):83-8.

Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(5-6):737-47.

Arana B, Rizzo N, Diaz A. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: a review. *Med Microbiol Immunol.* 2001;190(1-2):93-5.

Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis.* 1996;2(2):145-6.

Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Mancheno M, Rodriguez R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004;91(2):153-60.

Asilian A, Faghihi G, Siadat AH, Hejazi H, Shahtalebi M, Sadeghian G, *et al.* Efficacy of paromomicin and gentamicin patches in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J.* 2006;12(6):931-3.

Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(25):16093-8.

Barr SD, Gedamu L. Cloning and characterization of three differentially expressed peroxidoxin genes from *Leishmania chagasi*. Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals. *J Biol Chem.* 2001;276(36):34279-87.

Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, *et al.* Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes Infect.* 2005;7(13):1370-5.

Bauer E, Guo Z, Ueng YF, Bell LC, Zeldin D, Guengerich FP. Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol.* 1995;8(1):136-42.

Belloli C, Ceci L, Carli S, Tassi P, Montesissa C, De Natale G, *et al.* Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together: implications for therapy of leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 1995;58(2):123-7.

Berman JD, Grogl M. *Leishmania mexicana*: chemistry and biochemistry of sodium stibogluconate (Pentostam). *Exp Parasitol.* 1988<sup>a</sup>;67(1):96-103.

Berman JD, Gallalee JF, Gallalee JV. Pharmacokinetics of pentavalent antimony (Pentostam) in hamsters. *Am J Trop Med Hyg* 1988<sup>b</sup>; 39(1):41-5.

Berman JD, Hanson WL, Lovelace JK, Waits VB, Jackson JE, Chapman WL, Jr., *et al.* Activity of purine analogs against *Leishmania donovani* in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(1):111-3.

Berman JD, Melby PC, Neva FA. Concentration of Pentostam in human breast milk. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83(6):784-5.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;27(6):916-20.

Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis.* 1988;10(3):560-86.

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

Bhattacharya G, Herman J, Delfin D, Salem MM, Barszcz T, Mollet M, *et al.* Synthesis and antitubulin activity of N1- and N4-substituted 3,5-dinitro sulfanilamides against African trypanosomes and *Leishmania*. *J Med Chem.* 2004;47(7):1823-32.

Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K, Das VR, Kumar N, Lal C, Verma N, Singh VP, Ranjan A, Verma RB, Anders G, Sindermann H,



Ganguly NK. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007;196(4):591-8.

Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(2):158-66.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol.* 2003;19(5):232-9.

Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, *et al.* Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3073-9.

Bryceson AD, Chulay JD, Ho M, Mugambii M, Were JB, Muigai R, *et al.* Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. I. Clinical and immunological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(5):700-4.

Bryceson A. Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2001;190(1-2):81-4.

Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *J Infect Dis.* 1999;179(6):1485-94.

Bueding E, Mansour JM. The relationship between inhibition of phosphofructokinase activity and the mode of action of trivalent organic antimonials on *Schistosoma mansoni*. *Br J Pharmacol Chemother.* 1957;12(2):159-65.

Burke MD, Mayer RT. Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. *Drug Metab Dispos.* 1975 3(4):245-53.

Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T & Mayer RT. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced-cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* 1985 34: 3337-3345.

Callahan HL, Portal IF, Bensinger SJ, Grogl M. *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res.* 2004;120(3):166-72.

Carrio J, Portus M. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol.* 2002;2:11.

Carter NS, Drew ME, Sanchez M, Vasudevan G, Landfear SM, Ullman B. Cloning of a novel inosine-guanosine transporter gene from *Leishmania donovani* by functional rescue of a transport-deficient mutant. *J Biol Chem.* 2000;275(27):20935-41.

Cascio A, di Martino L, Occorsio P, Giacchino R, Catania S, Gigliotti AR, *et al.* A 6 day course of liposomal amphotericin B in the treatment of infantile visceral leishmaniasis: the Italian experience. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(1):217-20.

CDC, 2007. Parasitic Disease Information. *Leishmania* infection (leishmaniasis). <http://www.cdc.gov/Ncidod/dpd/parasites/leishmania/default.htm>. Acesso em: dezembro 2007.

Chang KP. *Leishmania donovani*: promastigote--macrophage surface interactions in vitro. *Exp Parasitol.* 1979;48(2):175-89.

Chang CS, Chang KP. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1985;16(3):267-76.

Chapman WL, Jr., Hanson WL, Waits VB, Kinnamon KE. Antileishmanial activity of selected compounds in dogs experimentally infected with *Leishmania donovani*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1979;21(4):189-93.

Chulay JD, Anzeze EM, Koech DK, Bryceson AD. High-dose sodium stibogluconate treatment of cutaneous leishmaniasis in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77(5):717-21.

Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(1):69-72.

Clarke SE, Baldwin SJ, Bloomer JC, Ayrton AD, Sozio RS, Chenery RJ. Lauric acid as a model substrate for the simultaneous determination of cytochrome P450 2E1 and 4A in hepatic microsomes. *Chem Res Toxicol*. 1994;7(6):836-42.

Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetich S, *et al.* Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin Infect Dis*. 2004;38(5):612-9.

Coombs GH, Wolf CR, Morrison VM, Craft JA. Changes in hepatic xenobiotic-metabolising enzymes in mouse liver following infection with *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;41(1):17-24.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(1):111-26.

Cruz A, Rainey PM, Herwaldt BL, Stagni G, Palacios R, Trujillo R, *et al.* Pharmacokinetics of antimony in children treated for leishmaniasis with meglumine antimoniate. *J Infect Dis*. 2007;195(4):602-8.

Cruz I, Morales MA, Noguera I, Rodriguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*. 2002;359(9312):1124-5.

Da Silva SA, Costa SS, Mendonca SC, Silva EM, Moraes VL, Rossi-Bergmann B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Trop.* 1995;60(3):201-10.

DATASUS. Sistema de Agravos de Notificação. Indicadores de morbidade e fatores de risco. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2006/matriz.htm#morb>. Acesso em: 28/12/2007.

Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs.* 1998;56(6):1009-18.

Davies CR, Mazloumi Gavgani AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology.* 1999;119 ( Pt 3):247-57.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Publica.* 2000;16(4):925-50.

Deichmann WB, Henschler D, Holmsted B, Keil G. What is there that is not poison? A study of the Third Defense by Paracelsus. *Arch Toxicol.* 1986;58(4):207-13.

Delongas JL, Trabarel C, Guittin P. Easy Procedure for Milk Collection in Lactating Rats. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 1997;36(1):80-3.

Demicheli C, de Figueiredo TL, Carvalho S, Sinesterra RD, Lopes JC, Frézard F. Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. *Biometals.* 1999;12(1):63-6.

Demicheli C, Frezard F, Lecouvey M, Garnier-Suillerot A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta.* 2002 ;1570(3):192-8.

Demicheli C, Ochoa R, da Silva JB, Falcao CA, Rossi-Bergmann B, de Melo AL, *et al.* Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):100-3.

Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J.* 2004 ;381(Pt 2):405-12.

De-Oliveira AC, Da-Matta AC, Paumgartten FJ. *Plasmodium berghei* (ANKA): infection induces CYP2A5 and 2E1 while depressing other CYP isoforms in the mouse liver. *Exp Parasitol.* 2006;113(4):256-61.

De-Oliveira AC, Ribeiro-Pinto LF, Otto SS, Gonçalves A, Paumgartten FJ. Induction of liver monooxygenases by beta-myrcene. *Toxicology.* 1997;124(2):135-40.

De-Oliveira AC, Fidalgo-Neto AA, Paumgartten FJ. In vitro inhibition of liver monooxygenases by beta-ionone, 1,8-cineole, (-)-menthol and terpineol. *Toxicology.* 1999 Jul 1;135(1):33-41.

Desi I, Nagymajtenyi L, Schulz H. Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. *J Appl Toxicol.* 1998;18(1):63-70.

Desjeux P, Piot B, O'Neill K, Meert JP. [Co-infections of leishmania/HIV in south Europe]. *Med Trop (Mars).* 2001;61(2):187-93.

Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol.* 2006;24(3):165-70.

Dicker E, Cederbaum AI. Generation of reactive oxygen species and reduction of ferric chelates by microsomes in the presence of a reconstituted system containing ethanol, NAD<sup>+</sup> and alcohol dehydrogenase. *Alcohol Clin Exp Res.* 1990;14(2):238-44.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, *et al.* Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis.* 1997;25(5):1240-2.

Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, *et al.* Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(6):685-9.

DNDi, 2007. <http://www.dndi.org/cms>. Acesso em dezembro de 2007.

Dodge MA, Waller RF, Chow LM, Zaman MM, Cotton LM, McConville MJ, *et al.* Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites. *Mol Microbiol.* 2004;51(6):1563-75.

Dorea JG, Costa JM, Holzbecher J, Ryan DE, Marsden PD. Antimony accumulation in hair during treatment of leishmaniasis. *Clin Chem.* 1987;33(11):2081-2.

Drummond GS, Kappas A. Potent heme-degrading action of antimony and antimony-containing parasitocidal agents. *J Exp Med.* 1981;153(2):245-56.

Drummond GS, Kappas A. Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(10):6466-70.

Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, *et al.* Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* 1997;16(10):2590-8.

Edwards PR, Hrycay EG, Bandiera SM. Differential inhibition of hepatic microsomal alkoxyresorufin O-dealkylation activities by tetrachlorobiphenyls. *Chem Biol Interact.* 2007;169(1):42-52.

El-Kadi AO, Bleau AM, Dumont I, Maurice H, du Souich P. Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(9):1112-20.

el-On J, Hamburger AD. Topical treatment of New and Old World cutaneous leishmaniasis in experimental animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):734-7.

Ephros, M., A. Binun, P. Shaked, E. Waldman, and D. Zilberstein. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999 43:278-282

Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* 1992;46:695-729.

Fairlamb AH. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends Parasitol.* 2003;19(11):488-94.

Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, *et al.* In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(4):827-30.

Ferroni R, Mazzotta D, Mantovani G, Guarneri M, Fagioli F, Balboni PG, *et al.* Determination of antimony levels in organs of mice, treated with an antimony-albumin complex, by atomic absorption spectroscopy. *Farmaco [Prat].* 1987;42(5):123-9.

Fournet A, Ferreira ME, Rojas De Arias A, Torres De Ortiz S, Fuentes S, Nakayama H, *et al.* In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(11):2447-51.

Frezard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(3):913-6.

Frezard F, Garnier-Suillerot A. Permeability of lipid bilayer to anthracycline derivatives. Role of the bilayer composition and of the temperature. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1389(1):13-22.

FUNASA, 2000. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; 2000.

Genter MB, Clay CD, Dalton TP, Dong H, Nebert DW, Shertzer HG. Comparison of mouse hepatic mitochondrial versus microsomal cytochromes P450 following TCDD treatment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;342(4):1375-81.

Gerber GB, Maes J, Eykens B. Transfer of antimony and arsenic to the developing organism. *Arch Toxicol*. 1982;49(2):159-68.

Giavedoni LD. Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology. *J Immunol Methods*. 2005;301(1-2):89-101.

Gibson GG & Skett P. *Introduction to drug metabolism*. 2<sup>nd</sup> Ed. Stanley Thornes Publishers; 1994.

Goad LJ, Holz GG, Jr., Beach DH. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol*. 1984;10(2):161-70.

Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. Heme oxygenase-1 protects HepG2 cells against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(3):307-18.

Gonzalez FJ, Jaiswal AK, Nebert DW. P450 genes: evolution, regulation, and relationship to human cancer and pharmacogenetics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 2:879-90.

Goodwin LG, Page JE. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem J*. 1943;37(2):198-209.

Goyard S, Segawa H, Gordon J, Showalter M, Duncan R, Turco SJ, Beverley SM. An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;130(1):31-42.

Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A. [Change in human visceral leishmaniasis treatment in Italy: retrospective study of 630 patients]. *Parassitologia*. 2004;46(1-2):199-201.



Grimaldi G, Jr., Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(6):687-725.

Grimm SW, Dyroff MC, Philpot RM, Halpert JR. Catalytic selectivity and mechanism-based inactivation of stably expressed and hepatic cytochromes P450 2B4 and 2B5: implications of the cytochrome P450 2B5 polymorphism. *Mol Pharmacol.* 1994 ;46(6):1090-9.

Grote K, Hobler C, Andrade AJ, Grande SW, Gericke C, Talsness CE, *et al.* Effects of in utero and lactational exposure to triphenyltin chloride on pregnancy outcome and postnatal development in rat offspring. *Toxicology.* 2007;238(2-3):177-85.

Guengerich FP, Beaune PH, Umbenhauer DR, Churchill PF, Bork RW, Dannan GA, *et al.* Cytochrome P-450 enzymes involved in genetic polymorphism of drug oxidation in humans. *Biochem Soc Trans.* 1987;15(4):576-8.

Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol.* 1991 ;4(2):168-79.

Guengerich FP. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact.* 1997;106(3):161-82.

Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* 2006;8(1):E101-11.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(8):494-501.

Gundacker C, Pietschnig B, Wittmann KJ, Lischka A, Salzer H, Hohenauer L, *et al.* Lead and mercury in breast milk. *Pediatrics.* 2002;110(5):873-8.

Hadighi R, Mohebali M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med.* 2006;3(5):e162.

Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:307-40.

Hantson P, Leonard ED, Crutzen-Fayt MC, Leonard A, Vandercam B, Delaere B, *et al.* Cytogenetic observations after meglumine antimoniate therapy for visceral leishmaniasis. *Pharmacotherapy.* 1996;16(5):869-71.

Hantson P, Luyasu S, Haufroid V, Lambert M. Antimony excretion in a patient with renal impairment during meglumine antimoniate therapy. *Pharmacotherapy.* 2000;20(9):1141-3.

Headley, J. V., M. S. Yong, P. W. Brooks, and A. Phillips. Fast-atom bombardment mass spectrometry of the organometallic parasiticide, meglumine antimonate. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995;9:372-376.

Higashimoto Y, Sakamoto H, Hayashi S, Sugishima M, Fukuyama K, Palmer G, *et al.* Involvement of NADPH in the interaction between heme oxygenase-1 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem.* 2005;280(1):729-37.

Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci.* 1992;17(11):463-8.

Isin EM, Guengerich FP. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1770(3):314-29.

Jacobs J, Roussel R, Roberts M, Marek D, Wood S, Walton H, *et al.* Effect of arsenite on induction of CYP1A and CYP2H in primary cultures of chick hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;150(2):376-82.

Jaiswal AK, Gonzalez FJ, Nebert DW. Comparison of human mouse P1450 upstream regulatory sequences in liver- and nonliver-derived cell lines. *Mol Endocrinol.* 1987 ;1(4):312-20.

Jha SN, Singh NK, Jha TK. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. *J Assoc Physicians India.* 1991;39(4):314-6.

Jha TK, Giri YN, Singh TK, Jha S. Use of amphotericin B in drug-resistant cases of visceral leishmaniasis in north Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(6):536-8.

Jha TK. Evaluation of allopurinol in the treatment of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77(2):204-7.

Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Felton JM, Sabin AJ, Horton J. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(6):1005-11.

Kaminsky L. The role of trace metals in cytochrome P4501 regulation. *Drug Metab Rev.* 2006;38(1-2):227-34.

Kaminsky LS, Dunbar DA, Wang PP, Beaune P, Larrey D, Guengerich FP, *et al.* Human hepatic cytochrome P-450 composition as probed by in vitro microsomal metabolism of warfarin. *Drug Metab Dispos.* 1984;12(4):470-7.

Kedzierski L, Malby RL, Smith BJ, Perugini MA, Hodder AN, Ilg T, *et al.* Structure of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase highlights similarities with human isoforms. *J Mol Biol.* 2006;363(1):215-27.

Kennedy RC, Shearer MH, Hildebrand W. Nonhuman primate models to evaluate vaccine safety and immunogenicity. *Vaccine.* 1997;15(8):903-8.

Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(1):99-103.

Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):558-67.

Kikuchi G, Yoshida T. Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol Cell Biochem.* 1983;53-54(1-2):163-83.

Kirby GM, Chemin I, Montesano R, Chisari FV, Lang MA, Wild CP. Induction of specific cytochrome P450s involved in aflatoxin B1 metabolism in hepatitis B virus transgenic mice. *Mol Carcinog.* 1994;11(2):74-80.

Kirk R & Sati MH. Notes on some cases of Sudan kala-azar treated with 4:4-diamidino stilbene. *Ann Trop Med Parasitol.* 1940 34:83.

Kirk R & Sati MH. Observations on the use of sodium antimony gluconate (sodium stibogluconate) in the treatment of kala-azar. *Ann Trop Med Parasit* 1947 41:14-21.

Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, Chiba K. Selectivities of human cytochrome P450 inhibitors toward rat P450 isoforms: study with cDNA-expressed systems of the rat. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(7):833-6.

Komori M, Nishio K, Kitada M, Shiramatsu K, Muroya K, Soma M, *et al.* Fetus-specific expression of a form of cytochrome P-450 in human livers. *Biochemistry.* 1990;29(18):4430-3.

Koop DR. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol Pharmacol.* 1986;29(4):399-404.

Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* 1992;6(2):724-30.

Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, *et al.* A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2001;98(4):247-61.

Lewis DH, Peters W. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Ann Trop Med Parasitol*. 1977;71(3):295-312.

Liu J, Qu W, Saavedra JE, Waalkes MP. The nitric oxide donor, O<sup>2</sup>-vinyl 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (V-PYRRO/NO), protects against cadmium-induced hepatotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310(1):18-24.

Louzir H, Melby PC, Ben Salah A, Marrakchi H, Aoun K, Ben Ismail R, *et al*. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis*. 1998;177(6):1687-95.

Lucumi A, Robledo S, Gama V, Saravia NG. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(8):1990-5.

Lugo de Yarbuh A, Anez N, Petit de Pena Y, Burguera JL, Burguera M. Antimony determination in tissues and serum of hamsters infected with *Leishmania garnhami* and treated with meglumine antimoniate. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994;88(1):37-41.

Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell Res*. 1997;232(2):339-48.

Maarouf M, Lawrence F, Croft SL, Robert-Gero M. Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitol Res*. 1995;81(5):421-5.

Mahnke A, Strotkamp D, Roos PH, Hanstein WG, Chabot GG, Nef P. Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 1997;337(1):62-8.

Maines MD, Plevoda B, Coban T, Johnson K, Stoliar S, Huang TJ, *et al*. Neuronal overexpression of heme oxygenase-1 correlates with an attenuated exploratory behavior and causes an increase in neuronal NADPH diaphorase staining. *J Neurochem*. 1998;70(5):2057-69.

McCallum RI. President's address. Observations upon antimony. Proc R Soc Med. 1977;70(11):756-63.

McDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M, Sacks D. Leishmania priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. Infect Immun. 2002;70(8):3994-4001.

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

Millesimo M, Zucca M, Caramello P, Savoia D. Evaluation of the immune response in visceral leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 1996;26(1):7-11.

Mimura M, Baba T, Yamazaki H, Ohmori S, Inui Y, Gonzalez FJ, *et al.* Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. Drug Metab Dispos. 1993;21(6):1048-56.

Minami M, Koshi K, Homma K, Suzuki Y. Changes of the activities of superoxide dismutase after exposure to the fume of heavy metals and the significance of zinc in the tissue. Arch Toxicol. 1982;49(3-4):215-25.

Miranda ES, Miekeley N, De-Carvalho RR, Paumgarten FJ. Developmental toxicity of meglumine antimoniate and transplacental transfer of antimony in the rat. Reprod Toxicol. 2006;21(3):292-300.

Miranda, ES. Estudo não-clínico da Segurança do Antimoniato de Meglumina na Gravidez. Dissertação de Mestrado Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 2003.

Molokhia MM, Smith H. The behaviour of antimony in blood. J Trop Med Hyg. 1969;72(9):222-5.

Monier S, Van Luc P, Kreibich G, Sabatini DD, Adesnik M. Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol.* 1988;107(2):457-70.

Monnet-Tschudi F, Zurich MG, Boschat C, Corbaz A, Honegger P. Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. *Rev Environ Health.* 2006;21(2):105-17.

Monostory K, Hazai E, Vereczkey L. Inhibition of cytochrome P450 enzymes participating in p-nitrophenol hydroxylation by drugs known as CYP2E1 inhibitors. *Chem Biol Interact.* 2004;147(3):331-40.

More B, Bhatt H, Kukreja V, Ainapure SS. Miltefosine: great expectations against visceral leishmaniasis. *J Postgrad Med.* 2003;49(1):101-3.

Mottram JC, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: enzyme activities of amastigotes and promastigotes and their inhibition by antimonials and arsenicals. *Exp Parasitol.* 1985;59(2):151-60.

Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, *et al.* Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(2):204-11.

Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, *et al.* Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(19):10383-7.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366(9496):1561-77.

Murray HW. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2004;2(2):279-92.

Muzitano MF, Tinoco LW, Guette C, Kaiser CR, Rossi-Bergmann B, Costa SS. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*. 2006;67(18):2071-7.

Nagata K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y, Kato R. Purification and characterization of four catalytically active testosterone 6 beta-hydroxylase P-450s from rat liver microsomes: comparison of a novel form with three structurally and functionally related forms. *J Biochem*. 1990;107(5):718-25.

Nakahira K, Takahashi T, Shimizu H, Maeshima K, Uehara K, Fujii H, *et al*. Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(6):1091-105.

Nakata K, Tanaka Y, Nakano T, Adachi T, Tanaka H, Kaminuma T, *et al*. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21(6):437-57.

Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, Yoshida T, Suzuki T. Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. *Neurosci Lett*. 2006;402(3):249-52.

Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J*. 1953;55(3):416-21.

Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajon JF. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis*. 1992;165(3):528-34.

Nebbia C, Dacasto M, Ceppa L, Gennaro Soffietti M, Spinelli P, Bergo V, *et al*. The comparative effects of subchronic administration of triphenyltin acetate (TPTA) on the hepatic and renal drug-metabolizing enzymes in rabbits and lambs. *Vet Res Commun*. 1997 ;21(2):117-25.



Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, *et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 1996;6(1):1-42.

Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 2004;14(1):1-18.

Oliveira-Neto MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Goncalves-Costa SC, Souza CF, *et al.* Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42(6):321-5.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg*. 1997<sup>a</sup>;57(6):651-5.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. *Pathol Biol (Paris)*. 1997<sup>b</sup>;45(6):496-9.

Oliveira-Neto MP, Mattos Mda S. Successful therapeutic response of resistant cases of mucocutaneous leishmaniasis to a very low dose of antimony. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(4):376-8.

Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(12):763-74.

Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*. 1962;237:1375-6.

Oropeza-Hernandez LF, Lopez-Romero R, Albores A. Hepatic CYP1A, 2B, 2C, 2E and 3A regulation by methoxychlor in male and female rats. *Toxicol Lett.* 2003;144(1):93-103.

Ossola JO, Tomaro ML. Heme oxygenase induction by cadmium chloride: evidence for oxidative stress involvement. *Toxicology.* 1995;104(1-3):141-7.

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* 2000;6(4):422-8.

Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat.* 2004;7(4-5):257-66.

Pagliano P, Carannante N, Rossi M, Gramiccia M, Gradoni L, Faella FS, Gaeta GB. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(2):229-33.

Pahar B, Li J, Rourke T, Miller CJ, McChesney MB. Detection of antigen-specific T cell interferon gamma expression by ELISPOT and cytokine flow cytometry assays in rhesus macaques. *J Immunol Methods.* 2003;282(1-2):103-15.

Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia* species. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64(3-4):187-93.

Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett & Doull's *Toxicology. The basic science of poisons.* Ed: Klaassen CD. Mc Graw-Hill; 2001.

Paumgartten FJ, Chahoud I. Embryotoxicity of meglumine antimoniate in the rat. *Reprod Toxicol.* 2001;15(3):327-31.

Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem.* 2003<sup>a</sup> ;278(50):49965-71.

Perez-Victoria FJ, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003<sup>b</sup>;47(8):2397-403.

Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, *et al.* Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 1994;32(3):746-9.

Poon R, Chu I, Lecavalier P, Valli VE, Foster W, Gupta S, *et al.* Effects of antimony on rats following 90-day exposure via drinking water. *Food Chem Toxicol.* 1998;36(1):21-35.

Porrozzi R, Pereira MS, Teva A, Volpini AC, Pinto MA, Marchevsky RS, *et al.* *Leishmania infantum*-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(10):926-37.

Pourahmad J, O'Brien PJ, Jokar F, Daraei B. Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 2003;17(5-6):803-10.

Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996;14(5):471-8.

Rees PH, Keating MI, Kager PA, Hockmeyer WT. Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Lancet.* 1980;2(8188):226-9.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Counihan H, Espinoza CJ, González JS, Davies CR. *Leishmania* (*Viannia*) spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*) *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(1):76-8.

Reiling J. The first French publicist – a bit of medical history. *JAMA*. 1906; 47:2015-2016.

Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1234-9.

Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(5):1076-82.

Roberts WL, Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(9):1842-6.

Rodrigues JC, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA, Souza W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(2):487-99.

Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. *J Infect Dis*. 2006;193(10):1375-83.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):456-65.

Ryan DE, Levin W. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol Ther*. 1990;45(2):153-239.

Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(2):289-309.

Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol.* 2002;3(11):1041-7.

Sakaguchi M, Mihara K, Sato R. A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence. *EMBO J.* 1987;6(8):2425-31.

Samanta G, Das D, Mandal BK, Chowdhury TR, Chakraborti D, Pal A, *et al.* Arsenic in the breast milk of lactating women in arsenic-affected areas of West Bengal, India and its effect on infants. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2007;42(12):1815-25.

Sampaio RN, de Paula CD, Sampaio JH, Furtado Rde S, Leal PP, Rosa TT, *et al.* [The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997<sup>a</sup>;30(6):457-63.

Sampaio RN, Marsden PD. [Treatment of the mucosal form of leishmaniasis without response to glucantime, with liposomal amphotericin B]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30(2):125-8.

Santos Ferreira C, Amato Neto V, Gakiya E, Bezerra RC, Alarcon RS. Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45(1):41-2.

Sati MH. Antimony treatment of Sudan kala-azar. *Ann Trop Med Parasitol.* 1942 36:1.

Schaumlöffel N, Gebel T. Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. *Mutagenesis.* 1998;13(3):281-6.

Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol.* 1967;3(2):113-23.

Schettini DA, Ribeiro RR, Demicheli C, Rocha OG, Melo MN, Michalick MS, *et al.* Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int J Pharm.* 2006;315(1-2):140-7.

Schleinkofer K, Sudarko, Winn PJ, Ludemann SK, Wade RC. Do mammalian cytochrome P450s show multiple ligand access pathways and ligand channelling? *EMBO Rep.* 2005;6(6):584-9.

Schonfelder G, Friedrich K, Paul M, Chahoud I. Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia.* 2004;6(5):584-94.

Seifert K, Perez-Victoria FJ, Stettler M, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F, *et al.* Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30(3):229-35.

Seliskar M, Rozman D. Mammalian cytochromes P450--importance of tissue specificity. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1770(3):458-66.

Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(12):3097-102.

Sereno D, Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(5):972-6.

Sereno D, Roy G, Lemesre JL, Papadopoulou B, Ouellette M. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1168-73.

Sharma R, Pervez S. Toxic metals status in human blood and breast milk samples in an integrated steel plant environment in Central India. *Environ Geochem Health.* 2005;27(1):39-45.

Sherwood JA, Gachihi GS, Muigai RK, Skillman DR, Mugo M, Rashid JR, *et al.* Phase 2 efficacy trial of an oral 8-aminoquinoline (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1994;19(6):1034-9.

Sheweita SA, Mubark J, Doenhofe MJ, Mostafa MH, Margison GP, O'Connor PJ, *et al.* Changes in the expression of cytochrome P450 isozymes and related carcinogen metabolizing enzyme activities in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J Helminthol.* 2002;76(1):71-8.

Shibahara S, Yoshida T, Kikuchi G. Induction of heme oxygenase by hemin in cultured pig alveolar macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 1978;188(2):243-50.

Shibahara S, Yoshida T, Kikuchi G. Mechanism of increase of heme oxygenase activity induced by hemin in cultured pig alveolar macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 1979;197(2):607-17.

Shibahara S. Regulation of heme oxygenase gene expression. *Semin Hematol.* 1988;25(4):370-6.

Shortt HE. Recent research on kala-azar in India. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1945 39(1): 13-31.

Sigerist HE. *On the history of medicine.* New York: MD Publications INC; 1960.

Singh AK, Tekwani BL, Guru PY, Rastogi AK, Pandey VC. Suppression of the hepatic microsomal cytochrome P-450 dependent mixed function oxidase activities in golden hamster during *Leishmania donovani* infection. *Pharmacol Res.* 1989;21(5):507-12.

Singh RK, Pandey HP, Sundar S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):331-44.

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006<sup>a</sup>;123(3):311-30.

Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica*. 1998;28(12):1129-65.

Snawder JE, Tirmenstein MA, Mathias PI, Toraason M. Induction of stress proteins in rat cardiac myocytes by antimony. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999;159(2):91-7.

Song BJ, Matsunaga T, Hardwick JP, Park SS, Veech RL, Yang CS, *et al*. Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol Endocrinol*. 1987;1(8):542-7.

Soto J, Fuya P, Herrera R, Berman J. Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimonate as treatment for American cutaneous leishmaniasis: controlled study. *Clin Infect Dis*. 1998;26(1):56-8.

Soto J, Hernandez N, Mejia H, Grogl M, Berman J. Successful treatment of New World cutaneous leishmaniasis with a combination of topical paromomycin/methylbenzethonium chloride and injectable meglumine antimonate. *Clin Infect Dis*. 1995;20(1):47-51.

Soto J, Valda-Rodriguez L, Toledo J, Vera-Navarro L, Luz M, Monasterios-Torrico H, *et al*. Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(5):577-81.

Soto J, Toledo J, Valda L, Balderrama M, Rea I, Parra R, Ardiles J, Soto P, Gómez A, Molleda F, Fuentelsaz C, Anders G, Sindermann H, Engel J, Berman J. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis*. 2007;44(3):350-6.

Spink DC, Katz BH, Hussain MM, Spink BC, Wu SJ, Liu N, *et al*. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in T-47D human breast cancer cells by benzo[a]pyrene is diminished by arsenite. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(3):262-9.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987;235(4792):1043-6.



Sudhandiran G, Shaha C. 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.* 2003;278(27):25120-32.

Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):345-52.

Sundar S, Gupta LB, Makharia MK, Singh MK, Voss A, Rosenkaimer F, *et al.* Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. *Ann Trop Med Parasitol.* 1999;93(6):589-97.

Sundar S, Gupta LB, Rastogi V, Agrawal G, Murray HW. Short-course, cost-effective treatment with amphotericin B-fat emulsion cures visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94(2):200-4.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Mishra M, Singh VP, Buffels R. Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. *Clin Infect Dis.* 2003;37(6):800-4.

Sundar S, Makharia A, More DK, Agrawal G, Voss A, Fischer C, *et al.* Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2000;31(4):1110-3.

Sundar S, Murray HW. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organ.* 2005;83(5):394-5.

Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15(6):593-8.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2001;6(11):849-54.

Suzuki H, Tashiro S, Sun J, Doi H, Satomi S, Igarashi K. Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem.* 2003;278(49):49246-53.

Szczesna-Skorupa E, Kemper B. NH<sub>2</sub>-terminal substitutions of basic amino acids induce translocation across the microsomal membrane and glycosylation of rabbit cytochrome P450IIC<sub>2</sub>. *J Cell Biol.* 1989;108(4):1237-43.

Tassi P, Ormas P, Madonna M, Carli S, Belloli C, De Natale G, *et al.* Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci.* 1994;56(2):144-50.

Tchounwou PB, Ishaque AB, Schneider J. Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride. *Mol Cell Biochem.* 2001;222(1-2):21-8.

Teklemariam S, Hiwot AG, Frommel D, Miko TL, Ganlov G, Bryceson A. Aminosidine and its combination with sodium stibogluconate in the treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88(3):334-9.

Teva A, Porrozzi R, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi G, Jr. *Leishmania (Viannia) braziliensis*-induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *Parasitology.* 2003;127(Pt 5):437-47.

Teva A, Porrozzi R, Oliveira-Neto MP, Grimaldi GJ. Responses of *Leishmania (Viannia) braziliensis* cutaneous infection to N-methylglucamine antimoniate in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *J Parasitol.* 2005;91(4):976-8.

Thakur CP, Kumar M, Pandey AK. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45(4):435-41.

Thakur CP, Narayan S, Ranjan A. Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in vivo. *Exp Parasitol.* 1996;84(3):400-9.

Thakur CP, Kanyok TP, Pandey AK, Sinha GP, Zaniewski AE, Houlihan HH, *et al.* A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94(4):429-31.

Thakur CP, Dedet JP, Narain S, Pratlon F. *Leishmania* species, drug unresponsiveness and visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(2):187-9.

Thakur CP, Pandey AK, Sinha GP, Roy S, Behbehani K, Olliaro P. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90(3):319-22.

Tirmenstein MA, Plews PI, Walker CV, Woolery MD, Wey HE, Toraason MA. Antimony-induced oxidative stress and toxicity in cultured cardiac myocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;130(1):41-7.

Torres-Santos EC, Da Silva SA, Costa SS, Santos AP, Almeida AP, Rossi-Bergmann B. Toxicological analysis and effectiveness of oral *Kalanchoe pinnata* on a human case of cutaneous leishmaniasis. *Phytother Res.* 2003;17(7):801-3.

Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH. Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(9):5311-6.

Tuckman E. Treatment of Chinese kala-azar with sodium antimony gluconate. *J Trop Med Hyg.* 1949;52(10):199-204.

Tully DB, Collins BJ, Overstreet JD, Smith CS, Dinse GE, Mumtaz MM, *et al.* Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;168(2):79-90.

Turco SJ, Spath GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol.* 2001;17(5):223-6.

Ursinyova M, Masanova V. Cadmium, lead and mercury in human milk from Slovakia. *Food Addit Contam.* 2005;22(6):579-89.

Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, *et al.* Effect of metals on polycyclic aromatic hydrocarbon induction of CYP1A1 and CYP1A2 in human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;170(2):93-103.

Valladares JE, Alberola J, Esteban M, Arboix M. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet Rec.* 1996;138(8):181-3.

Valladares JE, Riera C, Alberola J, Gallego M, Portus M, Cristofol C, *et al.* Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 1998;75(1):33-40.

Veiga JP, Rosa TT, Kimachi T, Wolff ER, Sampaio RN, Gagliardi AR, *et al.* [Renal function in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimony compounds]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1985;27(6):298-302.

Veiga JP, Wolff ER, Sampaio RN, Marsden PD. Renal tubular dysfunction in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. *Lancet.* 1983;2(8349):569.

Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(8):3010-5.

Vianna, G., 1912. *In*: Report of a meeting of the Sociedade Brasileira de Dermatologia (Sessão ordinaria) Arquivos Brasileiros de Medicina 2: 426-428.

Vincent R, Goegan P, Johnson G, Brook JR, Kumarathasan P, Bouthillier L, *et al.* Regulation of promoter-CAT stress genes in HepG2 cells by suspensions of particles from ambient air. *Fundam Appl Toxicol.* 1997;39(1):18-32.

Walters LL, Chaplin GL, Modi GB, Tesh RB. Ultrastructural biology of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40(1):19-39.

Wang Y, DuBois JL, Hedman B, Hodgson KO, Stack TD. Catalytic galactose oxidase models: biometric Cu(II)-phenoxy-radical reactivity. *Science.* 1998;279(5350):537-40.

Wappelhorst O, Kuhn I, Heidenreich H, Markert B. Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition.* 2002;18(4):316-22.

Wasunna MK, Rashid JR, Mbui J, Kirigi G, Kinoti D, Lodenyo H, *et al.* A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(5):871-6.

Weina PJ, Neafie RC, Wortmann G, Polhemus M, Aronson NE. Old world leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. *Clin Infect Dis.* 2004;39(11):1674-80.

Werneck GL, Rodrigues L, Santos MV, Araujo IB, Moura LS, Lima SS, *et al.* The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 2002;83(1):13-8.

White MR, Chapman WL, Jr., Hanson WL. Chemotherapy of experimental visceral leishmaniasis in the opossum. *J Parasitol.* 1989;75(1):176-8.

WHO. Leishmaniasis: background information. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> acesso em: dezembro de 2007.

WHO-TDR. Leshmaniasis. <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/> acesso em: dezembro de 2007.

WHO Expert Committee on Leishmaniasis., World Health Organization. The leishmaniasis : report of a WHO expert committee [meeting held in Geneva from 10 to 16 November 1982]. Geneva: World Health Organization; 1984.

Wijers DJ. A ten years' study of kala-azar in Tharaka (Meru district, Kenya). I. Incidence studies from the records at Marimanti. *East Afr Med J.* 1971;48(10):533-50.

Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell.* 2000;5(1):121-31.

Yamazoe Y, Murayama N, Shimada M, Yamauchi K, Kato R. Cytochrome P450 in livers of diabetic rats: regulation by growth hormone and insulin. *Arch Biochem Biophys.* 1989;268(2):567-75.

Yamazoe Y, Shimada M, Maeda K, Kamataki T, Kato R. Specificity of four forms of cytochrome P-450 in the metabolic activation of several aromatic amines and benzo[a]pyrene. *Xenobiotica.* 1984;14(7):549-52.

Yao P, Li K, Song F, Zhou S, Sun X, Zhang X, *et al.* Heme oxygenase-1 upregulated by Ginkgo biloba extract: potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(8):1333-42.

Yardley V, Khan AA, Martin MB, Slifer TR, Araujo FG, Moreno SN, *et al.* In vivo activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):929-31.

Yeates C. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs.* 2002;3(10):1446-52.

Zerilli A, Ratanasavanh D, Lucas D, Goasduff T, Dreano Y, Menard C, *et al.* Both cytochromes P450 2E1 and 3A are involved in the O-hydroxylation of p-nitrophenol, a catalytic activity known to be specific for P450 2E1. *Chem Res Toxicol.* 1997;10(10):1205-12.

Zerpa O, Ulrich M, Blanco B, Polegre M, Avila A, Matos N, *et al.* Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br J Dermatol.* 2007;156(6):1328-35.

Zhai L, Chen M, Blom J, Theander TG, Christensen SB, Kharazmi A. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43(6):7

Zhang K, Showalter M, Revollo J, Hsu FF, Turk J, Beverley SM. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*. *EMBO J.* 2003;22(22):6016-26.

Zhang K, Hsu FF, Scott DA, Docampo R, Turk J, Beverley SM. *Leishmania* salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis. *Mol Microbiol.* 2005;55(5):1566-78.

Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 2002;6(2):189-98.

## **CAPÍTULO VI. ANEXOS**



**Anexo I:** Concentração de antimônio total em plasma ( $\mu\text{g/g}$ ) de macacos Rhesus após a primeira injeção intramuscular com as doses de 5 ou 20 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{kg}$  de antimoniato de meglumina.

| <b>5 mg <math>\text{Sb}^{\text{V}}/\text{kg}</math></b> |                                  |       |       |       |       |       |              |              |
|---|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|--------------|
| Hora  | <b>Identificação dos macacos</b> |       |       |       |       |       | <b>Média</b> | <b>DP</b>    |
| coleta  | S62                              | 140   | 142   | O6    | T32   | U48   |              |              |
| 0   | 0,002                            | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | <b>0,002</b> | <b>0,000</b> |
| 2   | 0,000                            | 0,105 | 0,121 | 0,087 | 0,082 | 0,086 | <b>0,080</b> | <b>0,042</b> |
| 4   | 1,326                            | 3,285 | 1,711 | 1,439 | 0,926 | 1,246 | <b>1,655</b> | <b>0,838</b> |
| 6   | 0,172                            | 0,510 | 0,117 | 0,238 | 0,098 | 0,074 | <b>0,201</b> | <b>0,162</b> |
| 24  | 0,014                            | 0,039 | 0,018 |       | 0,014 | 0,013 | <b>0,020</b> | <b>0,011</b> |

| <b>20 mg <math>\text{Sb}^{\text{V}}/\text{kg}</math></b> |                                  |     |     |     |     |     |              |           |
|--|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|-----------|
| Hora   | <b>Identificação dos macacos</b> |     |     |     |     |     | <b>Média</b> | <b>DP</b> |
| coleta   | M2                               | U12 | L30 | O34 | U46 | X53 |              |           |
| 0  | 0,0                              | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,003        | 0,001     |
| 2  | 0,5                              | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,333        | 0,076     |
| 4  | 3,6                              | 2,2 | 5,2 | 5,6 | 4,5 | 2,7 | 4,002        | 1,355     |
| 6  | 0,2                              | 0,2 | 0,5 | 0,7 | 0,3 | 0,2 | 0,342        | 0,186     |
| 24   | 0,0                              | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,065        | 0,043     |

DP – desvio padrão

**Anexo II:** Concentração de antimônio total em papa de hemácias ( $\mu\text{g/g}$ ) de macacos Rhesus após a primeira injeção intramuscular com as doses de 5 ou 20 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}$ /kg de antimoniato de meglumina.

| 5 mg $\text{Sb}^{\text{V}}$ /kg |                           |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Hora                            | Identificação dos macacos |       |       |       |       |       | Média | DP    |
| coleta                          | S62                       | 140   | 142   | O6    | T32   | U48   |       |       |
| 0                               | 0,002                     | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,000 |
| 2                               | 0,024                     | 0,024 | 0,017 | 0,025 | 0,016 | 0,019 | 0,021 | 0,004 |
| 4                               | 0,244                     | 0,277 | 0,207 | 0,185 | 0,095 | 0,156 | 0,194 | 0,065 |
| 6                               | 0,043                     | 0,103 | 0,047 | 0,074 | 0,030 | 0,046 | 0,057 | 0,027 |
| 24                              | 0,045                     | 0,056 | 0,058 | 0,000 | 0,040 | 0,057 | 0,043 | 0,022 |

| 20 mg $\text{Sb}^{\text{V}}$ /kg |                           |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------------------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Hora                             | Identificação dos macacos |       |       |       |       |       | Média | DP    |
| coleta                           | M2                        | U12   | L30   | O34   | U46   | X53   |       |       |
| 0                                | 0,002                     | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,000 |
| 2                                | 0,045                     | 0,000 | 0,039 | 0,059 | 0,062 | 0,051 | 0,043 | 0,023 |
| 4                                | 0,424                     | 0,456 | 0,000 | 0,924 | 0,841 | 0,395 | 0,507 | 0,336 |
| 6                                | 0,120                     | 0,115 | 0,000 | 0,138 | 0,119 | 0,098 | 0,098 | 0,050 |
| 24                               | 0,131                     | 0,101 | 0,150 | 0,068 | 0,128 | 0,100 | 0,113 | 0,029 |

DP – desvio padrão

**Anexo III:** Concentração de antimônio total em papa de hemácias de macacos Rhesus tratados com 5 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de antimoniato de meglumina durante 21 dias consecutivos.

| <b>Dias</b> | <b>S62</b> | <b>140</b> | <b>142</b> | <b>O6</b> | <b>T32</b> | <b>U48</b> | <b>Média</b> |
|-------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|--------------|
| <b>0</b>    | 0,002      | 0,002      | 0,002      | 0,002     | 0,002      | 0,002      | <b>0,002</b> |
| <b>2</b>    | 0,045      | 0,056      | 0,058      | 0,000     | 0,040      | 0,057      | <b>0,043</b> |
| <b>5</b>    | 0,090      | 0,000      | 0,000      | 0,035     | 0,042      | 0,019      | <b>0,038</b> |
| <b>9</b>    | 0,136      | 0,138      | 0,195      | 0,043     | 0,074      | 0,137      | <b>0,105</b> |
| <b>12</b>   | 0,142      | 0,099      | 0,201      | 0,066     | 0,085      | 0,149      | <b>0,108</b> |
| <b>16</b>   | 0,182      | ND         | 0,193      | 0,102     | 0,102      | 0,142      | <b>0,185</b> |
| <b>19</b>   | 0,157      | 0,181      | 0,215      | 0,084     | 0,094      | 0,175      | <b>0,132</b> |
| <b>22</b>   | 0,238      | 0,235      | 0,271      | 0,098     | 0,094      | 0,145      | <b>0,157</b> |
| <b>23</b>   | 0,179      | 0,207      | 0,248      | ND        | 0,101      | 0,199      | <b>0,159</b> |
| <b>26</b>   | 0,132      | 0,150      | 0,056      | 0,062     | 0,078      | 0,115      | <b>0,089</b> |
| <b>30</b>   | 0,078      | 0,097      | 0,106      | 0,132     | 0,051      | 0,090      | <b>0,083</b> |
| <b>33</b>   | 0,075      | 0,048      | 0,075      | 0,041     | 0,040      | 0,058      | <b>0,053</b> |
| <b>37</b>   | 0,056      | 0,038      | 0,027      | 0,036     | 0,046      | 0,033      | <b>0,039</b> |
| <b>40</b>   | 0,045      | 0,058      | 0,050      | 0,031     | 0,029      | 0,049      | <b>0,043</b> |
| <b>44</b>   | 0,040      | 0,055      | 0,044      | 0,024     | 0,026      | 0,038      | <b>0,039</b> |
| <b>47</b>   | 0,028      | 0,041      | 0,035      | 0,018     | 0,019      | 0,029      | <b>0,031</b> |
| <b>51</b>   | 0,000      | 0,025      | 0,000      | 0,015     | 0,016      | 0,024      | <b>0,026</b> |
| <b>54</b>   | 0,024      | 0,038      | 0,036      | 0,017     | 0,019      | 0,025      | <b>0,030</b> |
| <b>58</b>   | 0,066      | 0,033      | 0,082      | 0,016     | 0,013      | 0,023      | <b>0,042</b> |
| <b>61</b>   | 0,017      | 0,027      | 0,019      | 0,011     | 0,011      | 0,015      | <b>0,023</b> |
| <b>68</b>   | 0,013      | 0,018      | 0,016      | 0,009     | 0,010      | 0,018      | <b>0,022</b> |
| <b>75</b>   | 0,011      | 0,014      | 0,000      | 0,020     | 0,012      | 0,014      | <b>0,024</b> |

**Anexo IV:** Concentração de antimônio total em papa de hemácias de macacos Rhesus tratados com 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de antimoniato de meglumina durante 21 dias consecutivos.

| <b>Dias</b> | <b>M2</b> | <b>U12</b> | <b>L30</b> | <b>O34</b> | <b>U46</b> | <b>X53</b> | <b>Média</b> |
|-------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| <b>0</b>    | 0,002     | 0,002      | 0,002      | 0,002      | 0,002      | 0,002      | <b>0,002</b> |
| <b>2</b>    | 0,131     | 0,101      | 0,150      | 0,068      | 0,128      | 0,100      | <b>0,113</b> |
| <b>5</b>    | 0,155     | 0,176      | 0,245      | 0,098      | 0,284      | 0,151      | <b>0,185</b> |
| <b>9</b>    | 0,216     | 0,186      | 0,346      | 0,133      | 0,000      | 0,233      | <b>0,223</b> |
| <b>12</b>   | 0,348     | 0,173      | 0,373      | 0,142      | 0,349      | 0,198      | <b>0,264</b> |
| <b>16</b>   | 0,275     | 0,339      | 0,400      | 0,172      | 0,341      | 0,221      | <b>0,291</b> |
| <b>19</b>   | 0,291     | 0,261      | 0,374      | 0,168      | 0,351      | 0,249      | <b>0,282</b> |
| <b>22</b>   | 0,331     | 0,304      | 0,540      | 0,216      | 0,426      | 0,321      | <b>0,356</b> |
| <b>23</b>   | 0,262     | 0,260      | 0,395      | 0,166      | 0,338      | 0,255      | <b>0,279</b> |
| <b>26</b>   | 0,176     | 0,173      | 0,288      | 0,075      | 0,227      | 0,188      | <b>0,188</b> |
| <b>30</b>   | 0,116     | 0,051      | 0,197      | 0,075      | 0,165      | 0,132      | <b>0,122</b> |
| <b>33</b>   | 0,090     | 0,096      | 0,145      | 0,060      | 0,145      | 0,098      | <b>0,106</b> |
| <b>37</b>   | 0,085     | 0,103      | 0,125      | 0,065      | 0,099      | 0,078      | <b>0,092</b> |
| <b>40</b>   | 0,071     | 0,070      | 0,100      | 0,046      | 0,099      | 0,071      | <b>0,076</b> |
| <b>44</b>   | 0,058     | 0,054      | 0,087      | 0,045      | 0,089      | 0,052      | <b>0,064</b> |
| <b>47</b>   | 0,050     | 0,049      | 0,064      | 0,034      | 0,072      | 0,046      | <b>0,052</b> |
| <b>51</b>   | 0,043     | 0,044      | 0,050      | 0,024      | 0,053      | 0,032      | <b>0,041</b> |
| <b>54</b>   | 0,044     | 0,043      | 0,057      | 0,033      | 0,065      | 0,045      | <b>0,048</b> |
| <b>58</b>   | 0,038     | 0,042      | 0,048      | 0,027      | 0,039      | 0,034      | <b>0,038</b> |
| <b>61</b>   | 0,030     | 0,032      | 0,033      | 0,019      | 0,038      | 0,024      | <b>0,029</b> |
| <b>68</b>   | 0,028     | 0,021      | 0,028      | 0,015      | 0,032      | 0,020      | <b>0,024</b> |
| <b>75</b>   | 0,019     | 0,021      | 0,000      | 0,000      | 0,026      | 0,020      | <b>0,021</b> |

**Anexo V:**Concentração de antimônio total em plasma de macacos Rhesus tratados com 5 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de antimoniato de meglumina durante 21 dias consecutivos.

|           | <b>S62</b> | <b>140</b> | <b>142</b> | <b>O6</b> | <b>T32</b> | <b>U48</b> | <b>Média</b> |
|-----------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|--------------|
| <b>0</b>  | 0,002      | 0,002      | 0,002      | 0,002     | 0,002      | 0,002      | 0,000        |
| <b>2</b>  | 0,014      | 0,039      | 0,018      | 0,000     | 0,014      | 0,013      | 0,020        |
| <b>5</b>  | 0,020      | 0,016      | 0,019      | 0,017     | 0,011      | 0,014      | 0,016        |
| <b>9</b>  | 0,033      | 0,034      | 0,041      | 0,013     | 0,014      | 0,019      | 0,026        |
| <b>12</b> | 0,049      | 0,052      | 0,042      | 0,019     | 0,013      | 0,021      | 0,033        |
| <b>16</b> | 0,028      | ND         | 0,043      | 0,021     | 0,020      | 0,020      | 0,047        |
| <b>19</b> | 0,034      | 0,041      | 0,052      | 0,031     | 0,027      | 0,030      | 0,036        |
| <b>22</b> | 0,039      | 0,042      | 0,039      | 0,018     | 0,013      | 0,013      | 0,027        |
| <b>23</b> | 0,044      | 0,058      | 0,047      | 0,024     | 0,027      | 0,029      | 0,038        |
| <b>26</b> | 0,034      | 0,043      | 0,034      | 0,024     | 0,019      | 0,018      | 0,029        |
| <b>30</b> | 0,016      | 0,019      | 0,021      | 0,016     | 0,016      | 0,008      | 0,016        |
| <b>33</b> | 0,014      | 0,021      | 0,019      | 0,014     | 0,012      | 0,010      | 0,015        |
| <b>37</b> | 0,013      | 0,017      | 0,014      | 0,011     | 0,009      | 0,007      | 0,012        |
| <b>40</b> | 0,008      | 0,018      | 0,012      | 0,012     | 0,007      | 0,009      | 0,011        |
| <b>44</b> | 0,008      | 0,011      | 0,012      | 0,007     | 0,006      | 0,006      | 0,008        |
| <b>47</b> | 0,007      | ND         | 0,009      | 0,006     | 0,000      | 0,006      | 0,007        |
| <b>51</b> | 0,006      | 0,007      | 0,006      | 0,007     | 0,005      | 0,004      | 0,006        |
| <b>54</b> | 0,006      | 0,009      | 0,007      | 0,007     | 0,006      | 0,005      | 0,007        |
| <b>58</b> | 0,007      | 0,008      | 0,008      | 0,006     | 0,005      | 0,006      | 0,006        |
| <b>61</b> | 0,009      | 0,008      | 0,007      | 0,007     | 0,006      | 0,005      | 0,007        |
| <b>68</b> | 0,005      | 0,007      | 0,007      | 0,009     | 0,005      | 0,004      | 0,006        |
| <b>75</b> | 0,004      | 0,005      | 0,000      | 0,000     | 0,003      | 0,003      | 0,004        |

ND – não determinado

**Anexo VI:** Concentração de antimônio total em plasma de macacos Rhesus tratados com 20 mg Sb<sup>V</sup>/kg/dia de antimoniato de meglumina durante 21 dias consecutivos.

| <b>Dias</b> | <b>M2</b> | <b>U12</b> | <b>L30</b> | <b>O34</b> | <b>U46</b> | <b>X53</b> | <b>Média</b> |
|-------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| <b>0</b>    | 0,005     | 0,002      | 0,002      | 0,002      | 0,002      | 0,002      | 0,000        |
| <b>2</b>    | 0,039     | 0,036      | 0,051      | 0,057      | 0,056      | 0,151      | 0,065        |
| <b>5</b>    | 0,068     | 0,052      | 0,045      | 0,071      | 0,057      | 0,049      | 0,057        |
| <b>9</b>    | 0,070     | 0,113      | 0,082      | 0,099      | 0,113      | 0,078      | 0,092        |
| <b>12</b>   | 0,077     | 0,085      | 0,110      | 0,081      | 0,064      | 0,092      | 0,085        |
| <b>16</b>   | 0,093     | 0,084      | 0,085      | 0,079      | 0,068      | 0,075      | 0,081        |
| <b>19</b>   | 0,092     | 0,090      | 0,078      | 0,080      | 0,080      | 0,081      | 0,083        |
| <b>22</b>   | 0,120     | 0,090      | 0,087      | 0,111      | 0,088      | 0,078      | 0,096        |
| <b>23</b>   | 0,089     | 0,070      | 0,078      | 0,087      | 0,293      | 0,074      | 0,115        |
| <b>26</b>   | 0,044     | 0,055      | 0,042      | 0,068      | 0,037      | 0,045      | 0,049        |
| <b>30</b>   | 0,028     | 0,024      | 0,024      | 0,032      | 0,023      | 0,024      | 0,026        |
| <b>33</b>   | 0,027     | 0,024      | 0,021      | 0,031      | 0,020      | 0,027      | 0,025        |
| <b>37</b>   | 0,022     | 0,021      | 0,018      | 0,023      | 0,024      | 0,017      | 0,021        |
| <b>40</b>   | 0,015     | 0,018      | 0,013      | 0,019      | 0,014      | 0,015      | 0,016        |
| <b>44</b>   | 0,013     | 0,013      | 0,011      | 0,013      | 0,013      | 0,013      | 0,013        |
| <b>47</b>   | 0,012     | 0,010      | 0,009      | 0,012      | 0,009      | 0,009      | 0,010        |
| <b>51</b>   | 0,011     | 0,010      | 0,008      | 0,013      | 0,007      | 0,009      | 0,010        |
| <b>54</b>   | 0,009     | 0,008      | 0,008      | 0,010      | 0,007      | 0,008      | 0,008        |
| <b>58</b>   | 0,009     | 0,010      | 0,008      | 0,009      | 0,010      | 0,009      | 0,009        |
| <b>61</b>   | 0,010     | 0,008      | 0,007      | 0,009      | 0,008      | 0,008      | 0,008        |
| <b>68</b>   | 0,008     | 0,008      | 0,008      | 0,006      | 0,008      | 0,008      | 0,007        |
| <b>75</b>   | 0,005     | 0,006      | 0,000      | 0,000      | 0,004      | 0,006      | 0,000        |

ND – não determinado

## O tempo

A vida é o dever que nós trouxemos para fazer em casa.

Quando se vê, já são seis horas!

Quando se vê, já é sexta-feira!

Quando se vê, já é natal...

Quando se vê, já terminou o ano...

Quando se vê perdemos o amor da nossa vida.

Quando se vê passaram 50 anos!

Agora é tarde demais para ser reprovado...

Se me fosse dado um dia, outra oportunidade, eu nem olhava o relógio.

Seguiria sempre em frente e iria jogando pelo caminho a casca dourada e inútil das  
horas...

Seguraria o amor que está a minha frente e diria que eu o amo...

E tem mais: não deixe de fazer algo de que gosta devido à falta de tempo.

Não deixe de ter pessoas ao seu lado por puro medo de ser feliz.

A única falta que terá será a desse tempo que, infelizmente, nunca mais voltará.

**Mário Quintana**