

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva**

**Estudo da eficácia pré-clínica de combinações binárias envolvendo miltefosina, anfotericina B lipossomal e infiltração intralesional de antimoniato de meglumina para tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis***

por

Michelle Andrade Porto Costa

Belo Horizonte  
2021

DISSERTAÇÃO

DSC – IRR

M. A. P. COSTA

2021

**MICHELLE ANDRADE PORTO COSTA**

**Estudo da eficácia pré-clínica de combinações binárias envolvendo miltefosina, anfotericina B lipossomal e infiltração intralesional de antimoniato de meglumina para tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Coletiva - área de concentração Políticas Públicas, Programas e Serviços de Saúde

Orientação: Dra. Gláucia Fernandes Cota

Coorientação: Dra Eliane de Moraes Teixeira

Belo Horizonte  
2021

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

C823e  
2021

Costa, Michelle Andrade Porto.

Estudo da eficácia pré-clínica de combinações binárias envolvendo miltefosina, anfotericina B lipossomal e infiltração intralesional de antimoniato de meglumina para tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Michelle Andrade Porto Costa. – Belo Horizonte, 2021

XVII, 76 f. . il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 66-72

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Saúde Coletiva pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva do Instituto René Rachou. Área de concentração Políticas Públicas, Programas e Serviços de Saúde

1. Leishmaniose cutânea/tratamento farmacológico 2. Conduta do Tratamento Medicamentoso 3. Farmacoterapia Combinada I. Título. II. Cota, Gláucia Fernandes (Orientação). III. Teixeira, Eliane de Moraes (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

**MICHELLE ANDRADE PORTO COSTA**

**Estudo da eficácia pré-clínica de combinações binárias envolvendo miltefosina, anfotericina B lipossomal e infiltração intralesional de antimoniato de meglumina para tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Coletiva - área de concentração Políticas Públicas, Programas e Serviços de Saúde

**Banca Examinadora:**

Prof Dra. Gláucia Fernandes Cota (IRR) Presidente

Prof Dr. Jadel Müller Kratz (Drugs For Neglected Diseases América Latina) Titular

Prof Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar (UFMG) Titular

Prof Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (IRR) Suplente

**Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 17/12/2022**

*Dedico esse trabalho:*

*A minha querida tia Iolanda, dona das mais belas risadas*

*&*

*a todos os portadores de leishmaniose cutânea.*

## AGRADECIMENTO

A Deus, pela dádiva da vida, por sempre guiar meus caminhos, por me mostrar sempre o melhor ângulo de todas as situações, por mais desafiadoras que possam parecer. Pela Sua infinita bondade, que sempre me propiciou as maiores bênçãos, sendo a maior delas a minha família.

Ao meu eterno amor, Wellington, meu grande companheiro de vida, que sempre me apoiou em todos os meus caminhos e sonhos, por mais loucos que pudessem parecer, e, com quem pude construir uma linda família.

Aos meus amados filhos, Gabriel e Beatriz, as minhas melhores e mais lindas obras, que mesmo tão novos, entenderam os momentos de ausência, necessários para chegar até aqui.

Aos meus amados pais, Marli e Barnabé, meu porto seguro e meus maiores exemplos, pelo incentivo em cada etapa, por não medir esforços para nos apoiar em todas as fases da vida, deixando alguns momentos suas próprias vidas para que nós pudéssemos seguir com a nossa.

À minha querida irmã, Karynne, pelo apoio, amizade, companheirismo, e por estar sempre presente em todos os momentos. À minha sogra, Maria, por cuidar dos meus amados filhos, nos momentos em que não podia estar presente.

A toda minha família, que sempre esteve presente em todas as fases da minha vida, mesmo de longe sempre torcendo e me incentivando.

À Dra. Eliane Teixeira, minha coorientadora, pelo incentivo, disponibilidade, carinho e confiança, por transmitir não só seu conhecimento, mas sua paixão pela pesquisa e pela melhoria do SUS.

À Dra. Gláucia Cota, minha orientadora, pela oportunidade, paciência, serenidade, e por contribuir de forma *sine qua non* com meu crescimento, pessoal e profissional. Sempre compartilhando seu conhecimento de forma muito generosa, assim como

seus esforços para melhoria da saúde pública. Obrigada, pelo auxílio na lapidação deste trabalho.

A equipe do Biotério de Experimentação do Instituto René Rachou, principalmente a Rosa e a Ana, que cuidaram sempre com muito carinho e cuidado dos animais durante os experimentos.

A todos do Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, pelos ensinamentos e apoio em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Coletiva e o Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos membros da banca pela disponibilidade e avaliação deste trabalho.

A todos que, de alguma forma contribuíram para concretização deste trabalho.

*Não esqueça do que você quer  
Não esqueça de querer aquilo  
Que vai te fazer feliz  
Não esqueça que a vida é pra viver  
Lembre sem medo de esquecer  
Não espere saber como vai ser  
Saiba que nunca vai saber  
Não esqueça que é tudo ilusão  
Não esqueça de lavar as mãos*

(Nico Nicolaiewsky)

## RESUMO

Leishmanioses integram o grupo de doenças infecciosas negligenciadas, sendo o tratamento uma das principais estratégias para o seu controle. O arsenal terapêutico disponível é limitado e marcado por reconhecida toxicidade, aliado a uma insuficiência persistente no desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, o reposicionamento de drogas e avaliação de novos esquemas posológicos de medicamentos existentes, incluindo as combinações, despontam como estratégias potencialmente úteis para ampliar as opções terapêuticas. Objetivo: avaliar a eficácia e a toxicidade de esquemas terapêuticos constituídos por combinações binárias dos medicamentos: miltefosina, anfotericina B lipossomal e antimoniato de meglumina para o tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em modelo animal. Metodologia: modelo experimental animal de leishmaniose cutânea utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos infectados por cepa de referência *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). Inicialmente definiu-se a dose da miltefosina a ser utilizada na combinação. As combinações binárias foram comparadas como os medicamentos em monoterapia, nomeadamente miltefosina na dose de 25mg/kg, via oral, por 20 dias consecutivos, anfotericina B lipossomal 10mg/kg, dose única, via intraperitoneal e antimoniato de meglumina por via intralesional em infiltração única. Para controle do experimento, foram constituídos grupos de animais mantidos sem tratamento. A eficácia clínica foi avaliada comparando-se o maior diâmetro da úlcera entre os grupos de animais no 23º dia após início do tratamento e, a eficácia parasitológica, pela comparação da carga parasitária na lesão e no baço. A toxicidade foi avaliada por meio da inspeção do comportamento dos animais e pela mensuração da massa corpórea. Resultados: redução significativa do tamanho da lesão em relação ao controle foi observada em animais tratados com antimoniato de meglumina, anfotericina B lipossomal associada com miltefosina e com antimoniato de meglumina. Na comparação entre as intervenções, apresentaram maior redução na lesão em relação ao grupo tratado com miltefosina, grupos de animais tratados com as combinações de anfotericina B com antimoniato de meglumina e com miltefosina. As combinações de anfotericina B lipossomal com antimoniato de meglumina e com miltefosina produziram significativa redução nas lesões dos animais tratados em comparação com o grupo controle, diferentemente do observado com o tratamento em monoterapia. Em relação ao parâmetro

parasitológico, animais tratados com anfotericina B lipossomal associada a antimoníato de meglumina apresentaram a maior redução na carga parasitária na lesão. Por sua vez, os tratamentos com miltefosina, seja em monoterapia ou em associação com antimoníato de meglumina, também se relacionaram com redução significativa da carga parasitária em relação aos grupos de animais tratados com anfotericina B lipossomal e antimoníato de meglumina, ambos em monoterapia. No baço, verificou-se que todos os grupos de animais tratados com combinação, assim como o grupo tratado com miltefosina, apresentaram redução significativa da carga parasitária em comparação com animais sem tratamento. Conclusão: Os esquemas baseados em anfotericina B lipossomal associada a miltefosina por via oral ou a antimoníato de meglumina em infiltração intralesional se mostraram clinicamente mais efetivos que os medicamentos usados individualmente, em modelo experimental de hamsters infectados por *L. braziliensis*, sugerindo a viabilidade da estratégia combinada também no tratamento da forma cutânea da leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; Tratamento; Combinação.

## Abstract

Leishmaniasis is a neglected infectious disease for which treatment is still the main control strategy. The available therapeutic arsenal is limited and marked by recognized toxicity, a situation aggravated by the lack of interest of governments and industry in the development of new drugs. In this context, drug repositioning and evaluation of new dosage regimens for existing drugs, including combinations, emerge as potentially useful strategies to expand therapeutic options. Objective: To evaluate the efficacy and toxicity of regimens based on combinations of the miltefosine, liposomal amphotericin B and meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Methodology: experimental animal model of cutaneous leishmaniasis using male hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by the reference strain *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). Initially, the dose of miltefosine to be used in the combination was defined as 25mg/kg. Binary combinations were compared with drugs in monotherapy, namely miltefosine at 25mg/kg, orally, for 20 consecutive days; liposomal amphotericin B 10mg/kg, single dose, intraperitoneally and meglumine antimony, intralesional route in a single infiltration. To control the experiment, one group of animals were kept untreated. The clinical efficacy was evaluated by comparing the largest ulcer diameter between the groups of animals on the 23rd day after the start of treatment and, the parasitological efficacy, by comparing the parasite load in the lesion and in the spleen. Toxicity was assessed by inspecting the behavior of animals and measuring body mass. Results: Significant lesion size reduction compared to control group was observed in animals treated with intralesional infiltration of meglumine antimoniate monotherapy, liposomal amphotericin B associated with miltefosine and liposomal amphotericin B associated with infiltration of meglumine antimoniate. Animals treated with the combinations of amphotericin B and meglumine antimoniate and amphotericin B and miltefosine exhibited higher reduction in the lesion compared to animals treated with miltefosine monotherapy. The combinations of liposomal amphotericin B with intralesional infiltration of meglumine antimoniate and liposomal amphotericin B with miltefosine produced a significant reduction in the lesions compared to the control group, differently from what was observed with the monotherapy treatment. Regarding the parasitological parameter, animals treated with liposomal amphotericin B associated with intralesional infiltration of meglumine antimoniate showed the highest reduction in the parasite load in the skin

lesion. In turn, treatments with miltefosine, either in monotherapy or in association with intralesional infiltration of meglumine antimoniate were also related to a significant reduction in the parasite load compared to animals treated with liposomal amphotericin B and meglumine antimoniate, both in monotherapy. In the spleen, we observed that all animals treated with combination of drugs, as well as the group treated with miltefosine, showed a significant reduction in the parasite load compared to animals without treatment. Conclusion: in an experimental model of hamsters infected by *L. braziliensis*, the regimens based on liposomal amphotericin B associated with oral miltefosine or intralesional infiltration of meglumine antimoniate were clinically more effective than the drugs used individually, suggesting the viability of the strategy also in the treatment of the cutaneous form of leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; Treatment; Combined therapy

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química do antimoniato de meglumina presente no Glucantime®.....	24
FIGURA 2 - Fórmula estrutural da Anfotericina B. ....	28
FIGURA 3 - Fórmula estrutural da Miltefosina.....	31

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Evolução do tamanho médio das lesões de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> submetidos a diferentes tratamentos com miltefosina em relação ao controle.....	43
GRÁFICO 2 - Estimativa da carga parasitária na lesão e no baço de hamsters infectados por <i>L. (V.) braziliensis</i> submetidos a diferentes intervenções .....	45
GRÁFICO 3 - Evolução da massa corporal dos animais, ao longo do tratamento, de acordo com a intervenção .....	46
GRÁFICO 4 – Mediana do maior diâmetro da lesão, ao longo do tratamento, nos diferentes grupos de animais de acordo com a intervenção terapêutica.....	48
GRÁFICO 5 - Estimativa da carga parasitária na lesão e no baço de hamsters infectados por <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados com diferentes intervenções terapêuticas .....	51
GRÁFICO 6 - Evolução da massa corporal dos animais, ao longo do tempo, de acordo com a intervenção .....	53

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Significância (valor de p) da comparação do tamanho das lesões no dia da eutanásia entre grupos de animais submetidos a diferentes intervenções.....	44
QUADRO 2 - Significância (valor de p) da comparação da magnitude da variação no tamanho da lesão ao longo do tratamento entre grupos submetidos a diferentes intervenções.....	44
QUADRO 3 - Significância (valor de p) para comparação da carga parasitária em baço de animais submetidos a diferentes intervenções.....	45
QUADRO 4 - Significância (valor de p) para a comparação entre carga parasitária em lesão de animais submetidos a diferentes intervenções.....	46
QUADRO 5 - Significância (valor de p) da comparação da massa corporal em D23, entre animais submetidos às diferentes intervenções.....	47
QUADRO 6 - Significância (valor de p) da comparação entre a magnitude da variação da massa corporal ao longo do tratamento nos diferentes grupos de intervenção.....	47
QUADRO 7 - Significância (valor de p) para a comparação do tamanho das lesões entre grupos em D23, de acordo com a intervenção (complementa TABELA 6).....	49
QUADRO 8 - Significância (valor de p) da comparação entre a magnitude da variação da medida da lesão ao longo do tratamento (D23/D1) de acordo com a intervenção (complementa TABELA 7).....	50
QUADRO 9 - Significância (valor de p) da comparação entre carga parasitária na lesão entre subgrupos de animais submetidos a diferentes intervenções terapêuticas.....	52
QUADRO 10 - Significância (valor de p) para comparação da carga parasitária no baço entre subgrupos de animais submetidos a diferentes intervenções terapêuticas.....	53
QUADRO 11 – Significância da comparação entre a média de massa corporal de grupos de animais submetidos a diferentes intervenções em D23.....	54
QUADRO 12 – Significância da comparação entre magnitude da variação da massa corpórea entre grupos submetidos a diferentes intervenções.....	55

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Evolução dos casos novos de leishmaniose tegumentar (LT) notificados ao SINAN, segundo ano de diagnóstico, no Brasil, de 2010 a 2019. ....	23
TABELA 2 – Mediana da magnitude (IRQ25-75%) da variação no tamanho da lesão de acordo com intervenção .....	44
TABELA 3 – Carga parasitária para <i>L. braziliensis</i> (média e desvio padrão) em baço de animais submetidos a diferentes intervenções.....	45
TABELA 4 - Carga parasitária para <i>L. braziliensis</i> (mediana e IQR25-75%) na lesão de pele de animais submetidos a diferentes intervenções .....	46
TABELA 5 – Magnitude da variação da massa corporal dos animais ao longo do tratamento, em relação ao peso em D1, nos diferentes grupos de intervenção.....	47
TABELA 6 – Mediana do tamanho da lesão (IQR25-75%) ao longo do tratamento de acordo com a intervenção .....	49
TABELA 7 – Magnitude da variação no tamanho da lesão (média e desvio padrão) ao fim do tratamento de acordo com intervenção .....	50
TABELA 8 – Magnitude da variação da massa corpórea (média e desvio padrão) ao longo do tratamento em grupos de animais submetidos a diferentes intervenções ..	55

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

<b>AnfLipo</b>	Anfotericina B lipossomal
<b>Anova</b>	Análise de Variância
<b>Anvisa</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>Concea</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>Conitec</b>	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>Glu IL</b>	Antimoniato de Meglumina Intralesional
<b>IQR</b>	Intervalo
<b>kg</b>	kilograma
<b>mg</b>	miligrama
<b>Milt</b>	Miltefosina
<b>mL</b>	mililitro
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana de Saúde
<b>PCPP</b>	Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias
<b>Sb</b>	Antimônio
<b>Sb<sup>III</sup></b>	Antimônio trivalente
<b>Sb<sup>V</sup></b>	Antimônio pentavalente
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>SVS</b>	Secretaria de Vigilância em Saúde

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	18
2. OBJETIVO .....	21
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1 Epidemiologia da Leishmaniose.....	22
3.2 Tratamento da leishmaniose cutânea .....	24
3.2.1 Antimonial pentavalente .....	24
3.2.2 Anfotericina B .....	28
3.2.3 Miltefosina .....	31
3.3 Combinação de medicamentos.....	33
3.4 Estudos pré-clínicos.....	35
4. METODOLOGIA .....	38
4.1 Tipo de estudo .....	38
4.2 Medicamentos.....	38
4.3 Ensaio experimentais .....	38
4.3.1 Infecção dos animais .....	38
4.3.2 Estudo para definição de dose ótima da miltefosina.....	38
4.3.3 Experimentos com combinações binárias envolvendo miltefosina, antimoniato de meglumina e anfotericina B lipossomal.....	39
4.3.4 Avaliação de eficácia clínica .....	40
4.3.5 Avaliação da eficácia parasitológica .....	40
4.3.6 Avaliação de toxicidade .....	41
4.3.7 Análise dos dados .....	41
4.3.8 Aspectos Éticos .....	42
5. RESULTADOS .....	43
5.1.1 Estudo para definição de dose ideal da miltefosina.....	43
5.1.2 Experimentos com combinações binárias envolvendo miltefosina, antimoniato de meglumina e anfotericina B lipossomal.....	48
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO .....	65
8. REFERÊNCIAS .....	66

9. APÊNDICES.....	73
10. ANEXO.....	76

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses integram o grupo de doenças infecciosas negligenciadas, assim designadas por prevalecerem em países pobres e atingirem as populações mais vulneráveis e com limitado acesso aos serviços de saúde. Apresentam uma ampla distribuição mundial e a maioria dos casos ocorre na África, Ásia e Américas (OPAS, 2019).

As principais manifestações clínicas da leishmaniose são a forma visceral, também conhecida por calazar, considerada a mais grave, e a tegumentar, cuja apresentação mais frequente se caracteriza por lesões cutâneas em áreas expostas do corpo, como face, braços e pernas. No Brasil, a leishmaniose tegumentar é causada principalmente pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Simultaneamente à lesão cutânea, ou anos após a ocorrência da lesão primária de pele, a infecção causada por espécies do subgênero *Viannia* pode progredir para a forma mucosa, que tem os tratos gastrointestinal e respiratório superior como sítios mais acometidos (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

O tratamento é uma das principais estratégias dos programas de controle das leishmanioses, em face da inexistência de vacinas e das dificuldades do controle vetorial da doença. Para o tratamento da leishmaniose cutânea no Novo Mundo, entendido como o continente americano, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Pan Americana de Saúde (OPAS, 2013) recomendam esquemas terapêuticos de uso local e sistêmico, de acordo com forma clínica e espécie de *Leishmania*. As alternativas para administração local são a pomada de paromomicina, infiltração intralesional de antimonial pentavalente e termoterapia. Já os tratamentos sistêmicos incluem isetionato de pentamidina, antimonial pentavalente e anfotericina B, em suas formulações convencional desoxicolato e lipossomal (WHO, 2010), além da miltefosina, inicialmente indicada para o tratamento de *L. guyanensis* e *L. panamensis*, mais recentemente também recomendada para tratamento de *L. braziliensis*. (MACHADO et al., 2010; VÉLEZ et al., 2010)

No Brasil, as recomendações do Ministério da Saúde para tratamento das leishmanioses estão contidas no Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar, com última revisão em 2017. Tal como os manuais internacionais, a escolha do tratamento varia de acordo com a forma clínica e com a espécie de *Leishmania*, estando disponíveis antimonial pentavalente (por via sistêmica e por infiltração intralesional), anfotericina B e pentamidina (BRASIL, 2017). Miltefosina, por sua vez, único medicamento oral atualmente existente para o tratamento da leishmaniose, só passou a ser disponibilizado no Brasil em 2021, mais de dois anos após o parecer favorável à sua incorporação ao Sistema Único de Saúde (SUS) emitido pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias, CONITEC (2018). Em virtude da inexistência de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a operacionalização da compra da miltefosina exigiu mediação do Fundo de Medicamentos Estratégicos da OPAS e as condições de prescrição e dispensação do medicamento foram regulamentadas na Resolução nº 337 de 11 de fevereiro de 2020.

Apesar de alguma variação entre as recomendações terapêuticas vigentes, o arsenal disponível para o tratamento das leishmanioses é limitado e marcado por reconhecida toxicidade, seja hepática, cardíaca, metabólica ou renal. À exceção da miltefosina, todos os outros medicamentos exigem administração parenteral, monitoramento laboratorial e deslocamentos frequentes do paciente aos serviços de saúde, o que contribui para redução da adesão e falhas no tratamento. Além da escassez de novos fármacos com ação leishmanicida, a falta crônica de investimento em inovação e desenvolvimento tecnológico em doenças infecciosas tropicais, tanto pelo setor público quanto pelas indústrias farmacêuticas (*apud* FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009), tornam o panorama futuro da abordagem das leishmanioses bastante desafiador.

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo e de alto custo, envolvendo várias etapas, que vão desde a descoberta ou síntese da molécula até a aprovação do medicamento pela agência reguladora. (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Estima-se que, de cada 30.000 moléculas sintetizadas, 20.000 (66,7%) entram na fase de estudos pré-clínicos, 200 (0,67%) entram na fase I dos estudos clínicos, 40 (0,13%) passam para a fase II, 12 (0,04%) entram na fase III e somente

nove (0,027%) são aprovadas pelos órgãos regulatórios. É importante mencionar ainda que, dos medicamentos aprovados, apenas um (0,003%) chega a ser incluído em protocolos terapêuticos (CALIXTO; JUNIOR, 2008), o que torna o desenvolvimento de novos medicamentos um processo cada vez mais desafiador e oneroso.

Neste contexto, é observada uma insuficiência persistente no desenvolvimento de medicamentos para doença negligenciadas, uma vez que não representam área de interessante para o setor privado, por afetarem principalmente países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, atingindo principalmente populações vulneráveis e de baixa renda. Entre 2000 e 2011, dos mais 850 novos produtos terapêuticos aprovados por diferentes órgãos reguladores, no mundo, apenas 4% eram produtos para doenças negligenciadas e apenas 1% das 336 novas moléculas estudadas se destinavam ao tratamento de doenças infecciosas tropicais afetando populações vulneráveis, na sua maioria para malária e doenças diarreicas, e nenhuma destinada ao tratamento da leishmaniose (PEDRIQUE *et al.*, 2013). Estes dados confirmam o desequilíbrio existente entre a carga da doença e o investimento em tecnologia e inovação.

Diante deste cenário, o reposicionamento de drogas e avaliação de novos esquemas posológicos de medicamentos existentes, incluindo as combinações, despontam como estratégias potencialmente úteis para ampliar as opções terapêuticas, reduzir toxicidade e prevenir resistência relacionadas aos fármacos. Neste contexto, este estudo propõe a avaliação de esquemas terapêuticos baseados em combinações binárias de miltefosina por via oral, anfotericina B lipossomal em dose única e antimoniato de meglumina por via intralésional, para o tratamento da leishmaniose cutânea experimental causada por *L. (V.) braziliensis*.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a eficácia e a toxicidade de esquemas terapêuticos constituídos por combinações binárias dos medicamentos miltefosina, anfotericina B lipossomal e antimoniato de meglumina para o tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cepa referência MHOM/BR/75/M2903, em modelo animal com hamsters.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar a eficácia clínica e parasitológica das combinações binárias de miltefosina por via oral com anfotericina B lipossomal por via intraperitoneal e com antimoniato de meglumina por infiltração intralesional;
2. Avaliar a eficácia clínica e parasitológica da combinação de anfotericina B lipossomal por via intraperitoneal com antimoniato de meglumina por infiltração intralesional;
3. Avaliar a toxicidade clínica de combinações binárias envolvendo miltefosina por via oral, anfotericina B lipossomal por via intraperitoneal e antimoniato de meglumina por infiltração intralesional.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Epidemiologia da Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, de grande impacto em saúde pública, endêmica em 98 países e que afeta 12 milhões de pessoas em todo o mundo. São relatados anualmente dois milhões de novos casos desta doença, com uma taxa de mortalidade de 30.000 ao ano (EMILIANO; ALMEIDA-AMARAL, 2018).

O agente etiológico das leishmanioses são parasitas do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae) que são transmitidos pela picada da fêmea infectada do flebotomíneo. Os hospedeiros da infecção na natureza são animais como canídeos, roedores e marsupiais. Aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* foram descritas e destas, 31 são conhecidas como parasitas de mamíferos, das quais 20 espécies são patogênicas para seres humanos (AKHOUNDI et al., 2016).

Diferentes espécies do gênero *Leishmania* causam manifestações clínicas diversas, desde lesões cutâneas autolimitadas até doenças viscerais com ameaça à vida. Características do parasita, do vetor e do hospedeiro são fatores que influenciam na manifestação clínica da doença (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Pelo menos sete espécies de *Leishmania* são responsáveis pela leishmaniose tegumentar no Brasil, sendo os principais agentes, por ordem de prevalência a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (CARVALHO et al., 2019).

São duas as formas clínicas principais da doença: leishmaniose visceral e tegumentar. A manifestação clínica da leishmaniose tegumentar depende da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do indivíduo infectado. Um espectro de formas clínicas da doença pode se desenvolver, dependendo do padrão da resposta celular imune-mediada, sendo a forma cutânea a manifestação clínica mais frequente (BRASIL, 2017).

Segundo a Organização Pan Americana de Saúde, em 2019, 41.617 novos casos de

leishmaniose cutânea e mucosa foram notificados por 17 países endêmicos das Américas, sendo 38% deles comunicados pelo Brasil (OPAS, 2020).

**TABELA 1** - Evolução dos casos novos de leishmaniose tegumentar (LT) notificados ao SINAN, segundo ano de diagnóstico, no Brasil, de 2010 a 2019.

<b>Evolução do caso</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>Total</b>
<b>Ignorado/ Branco</b>	5026	4509	6268	4816	6711	4362	3450	4839	3933	4639	<b>48553</b>
<b>Cura</b>	17667	17291	17810	13802	14351	15331	9539	12951	12586	10616	<b>141944</b>
<b>Abandono</b>	487	522	556	504	376	466	452	582	590	292	<b>4827</b>
<b>Óbito por LT</b>	18	20	18	23	22	12	11	16	15	19	<b>174</b>
<b>Óbito por outra causa</b>	116	118	93	106	93	106	81	70	85	60	<b>928</b>
<b>Transferência</b>	235	242	243	214	207	177	121	203	300	277	<b>2219</b>
<b>Mudança de diagnóstico</b>	221	233	210	191	229	240	282	279	303	232	<b>2420</b>
<b>Total</b>	<b>23770</b>	<b>22935</b>	<b>25198</b>	<b>19656</b>	<b>21989</b>	<b>20694</b>	<b>13936</b>	<b>18940</b>	<b>17812</b>	<b>16135</b>	<b>201065</b>

**FONTE:** Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan net

No Brasil, de acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período de 2010 a 2019, registrou-se um total de 1102 óbitos de pacientes com leishmaniose tegumentar (média anual de 110,2 óbitos). Deste total, 174 (15,8%) foram atribuídos diretamente à leishmaniose tegumentar, enquanto 928 (84,2%) foram registrados como devido a outras causas, conforme demonstrado na TABELA 1. Estes são dados intrigantes, cuja análise poderia auxiliar na compreensão do prognóstico e da abordagem da leishmaniose tegumentar no país. A evolução fatal em função do dano causado diretamente pelo parasita parece evento improvável, considerando a natureza das lesões, caracteristicamente em pele e mucosas das vias aéreas e digestivas, sendo raros os casos com comprometimento grave do trato respiratório levando diretamente ao óbito. Análises realizadas por SOUZA, 2018, a partir de banco de notificações SINAN entre os anos de 2007 e 2012, sugerem possível associação entre mortalidade e o tratamento com derivados de antimônio, sendo muito parecidos os perfis de casos cujos óbitos foram atribuídos diretamente à doença com aqueles cujos óbitos foram relacionados a outras causas, indicando a possibilidade de representarem o mesmo fenômeno.

## 3.2 Tratamento da leishmaniose cutânea

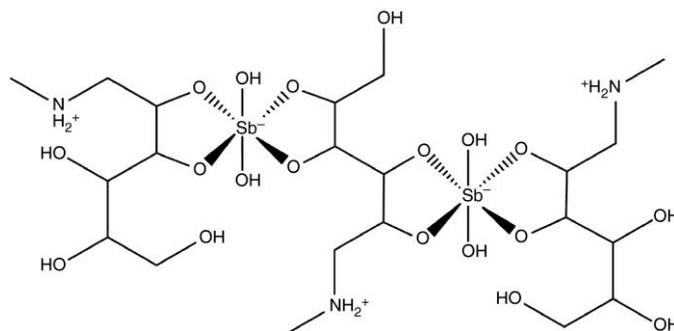
### 3.2.1 Antimonial pentavalente

Os antimoniais são utilizados desde a década de 1920 e continuam sendo, ainda hoje, a base para o tratamento da leishmaniose (PONTE-SUCRE et al., 2017).

Existem duas diferentes formulações de antimoniais pentavalente ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ) disponíveis comercialmente, o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio. O estibogluconato de sódio está disponível nos Estados Unidos da América, Europa e China e, o antimoniato de meglumina, na África e América Latina (LIMA et al., 2007). No Brasil, o antimoniato de meglumina é comercializado pela Sanofi Medley Farmacêutica Ltda, como o nome comercial de Glucantime®.

O antimoniato de meglumina é um sólido amorfo de difícil caracterização estrutural. Utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização eletro-spray (ESI-MS), demonstrou-se que este fármaco consiste em uma mistura de complexos polimerizados de antimônio-meglumina (FERREIRA, 2010). É apresentado comercialmente na forma de uma solução aquosa compreendendo uma mistura de complexos 2:3 e 3:3, com a fórmula estrutural mostrada na FIGURA 1. O grau de polimerização pode variar de lote para lote e com o tempo de armazenamento. O Glucantime® é comercializado em ampolas de 5 ml contendo 300 mg/ml de antimoniato de meglumina, que é equivalente à concentração do princípio ativo  $\text{Sb}^{\text{V}}$  de 81 mg/ml e dose total de  $\text{Sb}^{\text{V}}$  de 405 mg por ampola.

**FIGURA 1** - Estrutura química do antimoniato de meglumina presente no Glucantime®



FONTE: FRÉZARD et al., 2013

A farmacocinética do  $\text{Sb}^{\text{V}}$  pode ser dividida em três fases. A primeira fase de absorção rápida com meia-vida variando entre 0,36 e 0,85 horas e concentração plasmática máxima ocorrendo entre 0,5 e 2 horas; a segunda fase de eliminação curta com meia-vida média de 2 horas e a terceira fase de eliminação lenta com meia-vida média de 24-76 horas. A fase de eliminação lenta parece estar associada à conversão de  $\text{Sb}^{\text{V}}$  em  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , o que pode contribuir para a toxicidade associada à terapia de longa duração e altas doses. A depuração renal é a principal via de eliminação do antimoniato de meglumina, com a maior parte do antimônio sendo eliminado nas primeiras 24 horas. O maior acúmulo de antimônio ocorre no tecido hepático, seguido pela tireoide e coração. A distribuição na pele é ligeiramente atrasada em comparação com o sangue total, sendo as concentrações máximas atingidas após 2,1 e 1,5 horas, respectivamente. Por sua vez, as concentrações de antimônio na pele de pacientes com leishmaniose cutânea, medidas após 20 dias de terapia convencional com doses de 10–20 mg  $\text{Sb}^{\text{V}}$ /kg/dia, revelaram alta variabilidade da medida (intervalo de 7,46–70,68  $\mu\text{g}$ /grama de tecido) (KIP et al., 2018)

Há evidências que a ação do antimoniato de meglumina ocorra por mecanismos diretos e indiretos (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Os efeitos diretos estão associados às interações entre o fármaco e as biomoléculas dentro do parasita, sendo dois modelos principais propostos para explicar o mecanismo. O modelo  $\text{Sb}^{\text{V}}$  ativo assume que  $\text{Sb}^{\text{V}}$  exibe atividade anti-*Leishmania* inerente, através da formação de complexos com ribonucleosídeos, interrompendo assim a função de topoisomerasas, essenciais para a replicação e transcrição do DNA (CHAKRABORTY; MAJUMDER, 1988). Por sua vez, de acordo com outro modelo teórico, o  $\text{Sb}^{\text{V}}$  seria reduzido ao  $\text{Sb}^{\text{III}}$  mais ativo dentro de amastigotas de *Leishmania* por meio de um sistema redox envolvendo tripanotiona, um conjugado espermidina-glutationa, exclusivo do protozoário cinetoplastídeo (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004). Há evidências adicionais de que enzimas específicas do parasita participam desse processo de redução. O  $\text{Sb}^{\text{III}}$  assim formado interagiria com biomoléculas do parasita contendo sulfidrilas, incluindo peptídeos, proteínas e enzimas, levando a uma cascata de eventos indutores de estresse oxidativo e culminando com a fragmentação do DNA apoptose (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Os mecanismos indiretos de ação estariam associados à modulação das respostas do hospedeiro. Por fim, há

ainda evidências de que a droga aumentaria os níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes, como interleucina-1b (IL-1b), IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF-a), e potencializa a atividade fagocitária de monócitos e neutrófilos, que constituem a primeira linha de defesa contra o parasita, bem como a produção de ânions superóxidos por essas células. (MUNIZ-JUNQUEIRA; DE PAULA-COELHO, 2008)

A OMS recomenda a dose de 20 mg Sb<sup>v</sup> /kg por dia, por via intramuscular ou intravenosa por 20 dias (WHO, 2010). O Ministério da Saúde do Brasil recomenda doses entre 10 mg e 20 mg Sb<sup>v</sup> /kg/dia, sugerindo-se 15 mg Sb<sup>v</sup> /kg/dia durante 20 dias por via parenteral (BRASIL, 2017).

Eficácia clínica dos derivados de antimônio na leishmaniose cutânea foi avaliada em revisão sistemática publicada em 2008. De acordo com Tuon e colaboradores, a taxa média de cura nas Américas com antimoniato de meglumina administrado por via sistêmica (intramuscular - IM ou intravenosa - IV), na dose recomendada (20 mg/kg/dia), é de 76,5%. No entanto, observou-se diferença na eficácia do medicamento dependendo da região: 71,3% no Brasil e 91,4% na Colômbia (TUON et al., 2008). Já estratificado por espécie, as taxas de cura são descritas em 55,5% para pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis* ((NEVES et al., 2011)), entre 62% e 90% para pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* (SALDANHA et al., 1999; BERMÚDEZ et al., 2006) e 85,1% para pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* ou *L. (V.) panamensis* (VÉLEZ et al., 2010).

A taxa de eventos adversos relacionados aos tratamentos para leishmaniose tegumentar no Novo Mundo também foi avaliada em revisão sistemática, que reuniu 65 estudos e o total de 4359 pacientes tratados. O antimonial pentavalente foi utilizado no tratamento de 66,5% (n=2.900) dos pacientes, sendo que destes, 78,4% (n = 2.273) receberam doses habituais entre 10 e 20 mg/kg/dia. Foram observadas altas taxas de eventos adversos moderados a leves, sendo os mais frequentemente relatados dor musculoesquelética (78,6%), distúrbios gastrointestinais (71,4%), cefaleia (50%), anorexia (39,3%), astenia e fadiga (39,3%), febre (32,1%) e reações cutâneas (28,6%). As reações locais, mais frequentemente relatadas no caso de administração

intravenosa, foram tromboflebite, flebite e edema. Casos de pancreatite foram relatados em dois estudos. O efeito adverso laboratorial mais citado foi o aumento leve a moderado de enzimas hepáticas e pancreáticas. Outros eventos adversos incluíram níveis elevados de creatinofosfoquinase e alcalinofosfatase, eosinofilia, leucopenia e trombocitopenia. As anormalidades eletrocardiográficas mais frequentemente citadas foram prolongamento do intervalo QTc e distúrbios da repolarização ventricular. Arritmias foram relatadas em três estudos. Alguns eventos adversos raros, mas graves, foram citados em relatos de casos e geralmente ocorreram após o 15º dia de tratamento: trombocitopenia e paniculite eosinofílica. Nesta revisão, foram identificados três óbitos relacionados ao tratamento (OLIVEIRA et al., 2011).

A administração do antimoníato de meglumina por via intralesional apresenta vantagens potenciais, decorrentes da redução dos níveis séricos do antimônio, o que reduz sua toxicidade, diminuindo a ocorrência de eventos adversos sistêmicos graves, além de não necessitar de monitoramento laboratorial frequente (OLIVEIRA et al., 2011), permitindo, assim, esquemas terapêuticos mais flexíveis, fatores que tendem a reduzir o custo total do tratamento. (BRITO *et al.*, 2019)

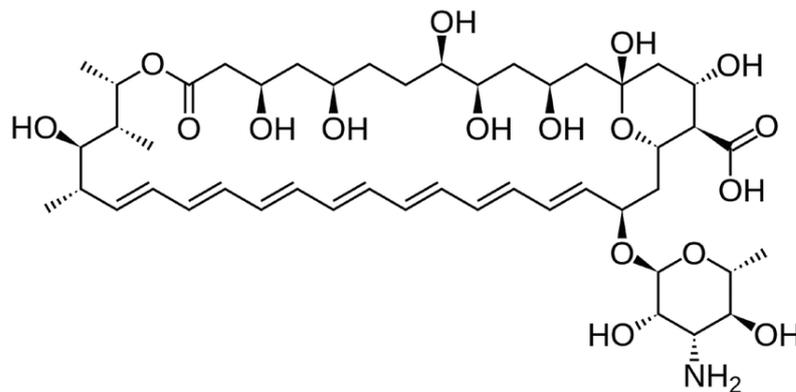
Em ensaio clínico unicêntrico fase II, realizado em Belo Horizonte, observou-se taxa de cura de 87% com a infiltração intralesional de antimoníato de meglumina, aplicado semanalmente por no máximo 8 infiltrações (RAMALHO, 2017). Além deste, outros estudos avaliando a eficácia da abordagem por infiltração intralesional foram reunidos em revisão sistemática em 2017, envolvendo 5.679 pacientes, com taxa de global de cura de 75% (IC 95% 68–82%) (BRITO; RABELLO; COTA, 2017).

O uso do antimoníato de meglumina administrado por via intralesional foi introduzido nas recomendações do Ministério da Saúde do Brasil em 2017, como o esquema de primeira escolha, para o tratamento da leishmaniose cutânea localizada, com lesão única de até 3 cm no seu maior diâmetro. O protocolo de tratamento consiste em uma a três aplicações de aproximadamente 5mL por sessão, com o intervalo entre as aplicações de 15 dias (BRASIL, 2017).

### 3.2.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico, com atividade antifúngica produzido por *Streptomyces nodosus*, isolado em meados de 1955. O nome anfotericina deriva da característica anfotérica de sua estrutura molecular (FIGURA 2), formando tanto sais solúveis em meio ácido como em meio básico. O fármaco é pouco solúvel na maioria dos solventes, com exceção do dimetilsulfóxido e da dimetilformamida, é praticamente insolúvel em soluções aquosas de pH neutro (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

**FIGURA 2** - Fórmula estrutural da Anfotericina B.



FONTE: FILIPPIN; SOUZA, 2006

A anfotericina B age ligando-se ao ergosterol nas membranas celulares, o que lhe confere propriedade lipofílica e alta capacidade de atingir o local da infecção, explicando em parte sua eficácia. Esta ligação pode levar a mudanças na permeabilidade da membrana celular, formação de poros, vazamento de íons, indução de choque metabólico e promoção da morte celular (SHIRZADI, 2019).

O desoxicolato de anfotericina B tem sido usado como tratamento de segunda linha para leishmaniose tegumentar (especialmente com falhas no tratamento com antimônio pentavalente) no Novo Mundo desde a década de 60 (WORTMANN *et al.*, 2010). A OMS recomenda, para leishmaniose cutânea, a dose de 0,7 mg/kg/dia, por infusão venosa, de 25 a 30 doses (WHO, 2010). Já de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, a dose recomendada varia de 0,7 a 1,0 mg/kg/dia, com dose total de 25 a 40 mg/kg, sendo a dose máxima diária de 50 mg/kg. (BRASIL, 2017). No Brasil

o desoxicolato de anfotericina B é registrado e comercializado pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, com o nome comercial Anforicin B®.

A toxicidade da anfotericina B está relacionada principalmente a disfunção renal, que é dose dependente. As reações adversas agudas ocorrem frequentemente e estão principalmente relacionadas à infusão, tais como febre, calafrios, tremores, náusea, vômitos e dor de cabeça. Também com alta taxa de ocorrência são os distúrbios eletrolíticos, em especial hipocalemia, hipernatremia e hipomagnesemia. Alterações cardiovasculares como hipotensão, hipertensão e arritmia cardíaca são observados com menor frequência, bem como os efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia). Os efeitos neurotóxicos em pacientes tratados com injeção endovenosa são raros. Observam-se hipertermia, confusão mental, depressão, delírio, comportamento psicótico, convulsão, tremores, perda de audição, opacidade da visão, dentre outras alterações acompanhadas por degeneração da bainha de mielina. A cardiotoxicidade foi descrita especialmente pela indução de arritmia ventricular, secundária a hipocalemia em pacientes com função renal diminuída, que são suscetíveis a essa alteração eletrolítica. Sua ocorrência é rara se o balanço eletrolítico for mantido, mas para a maioria dos pacientes, a manutenção requer suplemento de potássio e magnésio (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Entre as limitações do tratamento com desoxicolato de anfotericina B podemos citar a necessidade de ser administrada em ambiente hospitalar e de monitoramento laboratorial frequente.

Com o objetivo de atenuar sua toxicidade e aumentar o potencial terapêutico, formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas e incorporadas à prática clínica. A associação de lipoproteínas a drogas pode influenciar significativamente suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas, assim como sua toxicidade relativa. As preparações lipídicas de anfotericina B proporcionam várias vantagens em relação à formulação não lipídica, como menor taxa de reações infusionais, menor degradação enzimática, liberação mais controlada, direcionamento do medicamento para os sítios de ação, resultando em menor toxicidade (HAMILL, 2013).

A OMS recomenda para leishmaniose cutânea a dose de 2–3 mg/kg dia de anfotericina B lipossomal, por infusão, dose total 20–40 mg/kg. (WHO, 2010). O Ministério da Saúde do Brasil recomenda 2 a 5 mg/kg/dia, a depender da forma clínica, sem limite de dose máxima diária até atingir a dose total de 25 a 40 mg/kg, dependendo da resposta clínica para forma lipossomal (BRASIL, 2017). No Brasil estão disponíveis duas formulações lipídicas do medicamento: complexo lipídico de anfotericina B (Abelcept®), anfotericina B lipossomal (Ambisome®).

A eficácia da anfotericina B lipossomal foi avaliada em um estudo retrospectivo, realizado no centro médico do exército americano Walter Reed Army Medical Center, entre 2007 e 2009. Foram descritos 19 pacientes com média de idade de 29 anos (19 a 46 anos), 95% deles do sexo masculino, infectados com cinco diferentes espécies de *Leishmania* e tratados com anfotericina lipossomal. Observou-se cura das lesões em 84% dos pacientes com o primeiro ciclo de tratamento, os 16% restante obtiveram cura da lesão com um segundo ciclo do tratamento (WORTMANN *et al.*, 2010).

Em outro estudo retrospectivo realizado no Instituto de Doenças Infecciosas Emílio Ribas, em SP, Brasil, no período de 2005 a 2013, com 29 pacientes com idade média de 68,3 anos (34 a 85 anos), sendo 69% do sexo masculino, foi observada taxa de cura de 93% para leishmaniose mucosa no primeiro ciclo do tratamento, os 7% restantes atingiram os critérios de cura após o segundo ciclo do tratamento (CUNHA *et al.*, 2015).

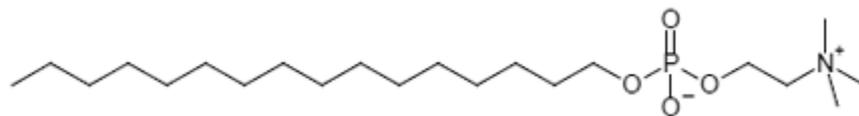
Também no Brasil e avaliando a eficácia da anfotericina lipossomal em pacientes com leishmaniose disseminada, infectados com *L. braziliensis*, ensaio clínico aberto, realizado na Bahia, incluiu 20 pacientes com idade média de  $38,6 \pm 15,6$  anos e a taxa de cura observada foi de 65% após 6 meses do tratamento (MACHADO *et al.*, 2015).

Baseado em evidências obtidas com outras doenças infecciosas, anfotericina B lipossomal está relacionada a menor taxa de reações infusionais e nefrotoxicidade do que a formulação desoxicolato, mas o seu alto custo ainda é impedimento para seu uso rotineiro em grande parte dos serviços de saúde (STONE *et al.*, 2016).

### 3.2.3 Metilfosina

Miltefosina é um éster de fosforilcolina de hexadecanol, também conhecido como hexadecilfosfocolina (FIGURA 3). A sua fórmula empírica é  $C_{21}H_{46}NO_4P$ , resultando em um peso molecular de 407,57 g/mol. Miltefosina é um composto anfifílico e zwitterion devido ao grupo amina quaternária (carga positiva) e ao grupo fosforila (carga negativa). Apresenta-se como um pó higroscópico branco e facilmente solúvel em água, solventes aquosos e orgânicos (DORLO *et al.*, 2012).

**FIGURA 3** - Fórmula estrutural da Miltefosina.



**FONTE:** DORLO *et al.*, 2012

Miltefosina foi originalmente desenvolvida para o tratamento do câncer e, posteriormente, teve suas atividades antifúngica e anti-*Leishmania* descobertas (SANTAREM *et al.*, 2014). O medicamento foi o primeiro e permanece a única alternativa oral aprovada para o tratamento da leishmaniose. Em 2002, foi registrado na Índia e na Alemanha. E posteriormente, foi aprovado para tratamento de leishmaniose visceral no Nepal, e para leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea na Argentina, Bangladesh, Bolívia, Colômbia, Equador, Guatemala, Honduras, México, Paquistão, Paraguai, Peru, Israel e os Estados Unidos. Miltefosina recebeu uma designação de medicamento órfão na União Europeia em 2002 e, nos EUA, em 2006. A OMS incluiu o medicamento em sua Lista Modelo de Medicamentos Essenciais em 2011, sublinhando a sua importância para a saúde pública (SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2018). Em 2018, a miltefosina foi incorporada como tratamento de primeira escolha para leishmaniose tegumentar no Brasil, pelo Ministério da Saúde, por meio da Portaria Nº 56 (CONITEC, 2018).

O seu mecanismo de ação contra leishmaniose não está completamente elucidado, embora tenha sido descrito como relacionado a um efeito direto sobre os parasitas ao interferir na biossíntese de fosfolipídeos e no metabolismo de alquil-lipídeos, afetando

o citocromo c oxidase mitocondrial, induzindo despolarização mitocondrial e diminuição dos níveis intracelulares de ATP e morte celular semelhante à apoptose (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017).

A miltefosina demonstrou embriotoxicidade e efeitos teratogênicos, nos estudos pré-clínicos, sendo, portanto, estritamente contra-indicada em mulheres grávidas (DORLO *et al.*, 2012). Devido a estes efeitos adversos, no Brasil, o medicamento tem seu uso regulamentado por portaria da ANVISA, que exige para mulheres em idade fértil a exclusão de gravidez por meio de teste sensível para dosagem de beta-HCG, seguida por terapia anticonceptiva com o mínimo de dois métodos distintos, sendo um deles de barreira. (BRASIL, 2020)

A miltefosina tem sido usada no tratamento de várias espécies de leishmaniose tegumentar do Novo Mundo, com eficácia variável. Os estudos realizados na Colômbia, onde a espécie mais frequente é *L. panamensis*, as taxas de cura foram superiores a 80%. Outro ensaio clínico posterior, também na Colômbia, encontrou uma taxa de cura inferior a 70%, atribuída à alta proporção de casos isolados de *L. braziliensis*. Em um estudo realizado na Bolívia, com doença causada por *L. braziliensis*, a miltefosina apresentou taxa de cura de até 80%, sem diferença com os antimoniais pentavalentes parenterais. No Brasil, a taxa de resposta com *L. braziliensis* foi de 75% (MACHADO *et al.*, 2010) e de 71,4% com *L. guyanensis* (CHRUSCIK-TALHARI *et al.*, 2011). Por sua vez, dados da Guatemala para *L. braziliensis* e *L. mexicana* revelaram baixa taxa de cura, em torno de 50% (SOTO *et al.*, 2004). Um relatório recente da Alemanha encontrou taxa de cura de 63% em 8 casos importados de leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* em viajantes da Bolívia, Costa Rica, Peru, Equador e Brasil (HARMS *et al.*, 2011). A disparidade nas taxas de cura obtidas nos diferentes estudos sugere a existência de sensibilidade intrínseca diferente entre as cepas de *L. braziliensis*, possivelmente relacionada à uma capacidade reduzida do parasita de internalizar a miltefosina a partir do meio extracelular (MONGE-MAILLO; LOPEZ-VELEZ, 2015).

Os eventos adversos mais comuns com miltefosina são vômitos, diarreia e elevação do nível das enzimas hepáticas. Outros eventos observados com menor frequência

incluem elevação da concentração de creatinina sérica e trombocitopenia. Entre aqueles raramente relatados estão dor escrotal e diminuição ou ausência de ejaculação e síndrome de Stevens-Johnson (VAKIL; FUJINAMI; SHAH, 2015).

### **3.3 Combinação de medicamentos**

Combinações de medicamentos é estratégia já adotada há muitos anos para tratar diversas doenças, como por exemplo hipertensão, aids, tuberculose, malária, entre outras. Existem muitas vantagens de usar terapia combinada. Por definição, terapia combinada é entendida como tratamento de doença com dois ou mais medicamentos para alcançar eficácia com doses menores ou medicamentos de menor toxicidade, quimiossensibilizar células para que um composto adicional possa ser mais potente, ganhar efeitos aditivos ou sinérgicos, ou combater a resistência adquirida esperada ou minimizar a possibilidade de desenvolvimento de resistência a medicamentos (KARJALAINEN; REPASKY, 2016).

Em primeiro lugar, é possível o aumento do efeito terapêutico, especialmente quando os medicamentos diferem em seu mecanismo de ação, mas produzem efeitos semelhantes. Em segundo lugar, em teoria, a combinação de medicamentos permitiria a redução das dosagens dos componentes individualmente, o que poderia contribuir para a diminuição da toxicidade. A terceira razão potencial seria minimizar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos (VAN GRIENSVEN *et al.*, 2010), um desafio comum para as condições infecciosas, que no caso das leishmanioses limitaria ainda mais um reduzido arsenal de drogas ativas (BUKOWSKA; GAJEK; MARCZAK, 2015).

Para as leishmanioses, o uso de combinações terapêuticas para a forma visceral da doença vem sendo avaliado há vários anos. Ensaio clínico randomizado controlado, de não inferioridade, realizado em dois hospitais em Bihar, Índia, comparando o tratamento padrão para leishmaniose visceral com combinações de drogas revelou taxa de cura de 93% para o tratamento padrão (infusão de 1 mg/kg de desoxicolato de anfotericina B em dias alternados por 30 dias, dose total de 15 mg/kg) e de 97,5% para a combinação da dose única de anfotericina B lipossomal (5mg/Kg) e miltefosina

(50mg por 7 dias). Os pacientes no grupo de combinação tiveram menos eventos adversos do que aqueles submetidos ao tratamento padrão (SUNDAR *et al.*, 2011).

Outro estudo, conduzido no Sudão e Quênia, avaliou eficácia e segurança de três regimes de tratamento. Foram observados as seguintes taxas de cura: 87% para o esquema de anfotericina B lipossomal (10 mg/kg, dose única) associada a estibogluconato de sódio (20 mg/kg/dia por 10 dias), 77% para anfotericina B lipossomal (10 mg/kg, dose única) associada a miltefosina (2,5 mg/kg/dia por 10 dias) e 72% para monoterapia com miltefosina (2,5 mg/kg/dia por 28 dias) (WASUNNA *et al.*, 2016).

Para leishmaniose tegumentar, uma revisão sistemática avaliou a combinação do antimoniato de meglumina com outras terapias, sendo reunidos 16 estudos em que os antimoniais pentavalentes foram administrados em combinação com pentoxifilina, fator estimulador de colônia de macrófagos de granulócitos, imiquimod, cetoconazol, curativo de poliéster contendo prata, proteína LEISH-F1 liofilizada, crioterapia, mel tópico e omeprazol. As taxas de cura foram, em geral, maiores para os grupos tratados com combinação quando comparado aos tratados com monoterapia. A combinação de antimoniato de meglumina com fator estimulador de colônia de macrófagos de granulócitos apresentou taxa de cura de 100%, com imiquimod entre 72% e 100%, com pentoxifilina entre 45% a 82%, com omeprazol 89%, com a proteína LEISH-F1 80% e com mel tópico 51%. O estibogluconato de sódio por infiltração intralesional combinado com cetoconazol obteve 90% de taxa de cura, com a proteína LEISH-F1 94%, com crioterapia 78% e com curativo de poliéster contendo prata 36%. (BERBERT *et al.*, 2018)

Atualmente, no Brasil, três estudos clínicos avaliando combinação de medicamentos para tratamento da leishmaniose tegumentar estão registrados, sendo dois no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) e um estudo no Clinicaltrials.gov. São eles: estudo avaliando a combinação de miltefosina e pentoxifilina para o tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa, registrado em 22/07/2019 sob número RBR-72dv9n; um ensaio envolvendo dose única de antimoniato de meglumina intralesional e paromomicina tópica em gel em comparação

com três aplicações intralesionais de antimoniato de meglumina, registro realizado sob número RBR-4ypn69 em 01/10/2020, e estudo de não inferioridade comparando a combinação de termoterapia e miltefosina com os tratamento de primeira linha, registrado em 17/08/2020 sob o número NCT04515186, os dois últimos ainda não iniciados.

### **3.4 Estudos pré-clínicos**

Nas ciências da vida, estudos pré-clínicos são usados para elucidar a biologia normal, para melhorar a compreensão da patogênese da doença e para desenvolver intervenções terapêuticas. Os modelos animais são valiosos, desde que os experimentos que os empregam sejam cuidadosamente planejados, interpretados e relatados. (LANDIS *et al.*, 2012)

A tradução clínica de novas estratégias de intervenção enfrenta desafios abrangentes. Primeiro, os pesquisadores devem avaliar um cenário virtualmente ilimitado de alvos, medicamentos, doses e regimes de tratamento em potencial. Em segundo lugar, o desenvolvimento clínico é extremamente caro e expõe os pacientes a intervenções não comprovadas e possivelmente tóxicas. Neste contexto, a pesquisa pré-clínica cumpre o importante papel de produzir evidências suficientemente convincentes para garantir os custos econômicos e morais do desenvolvimento clínico. (KIMMELMAN; MOGIL; DIRNAGL, 2014)

Em síntese, confirmar a eficácia e a toxicidade dos medicamentos ou da combinação dos mesmos, através de ensaios *in vivo* com animais, constitui etapa necessária para garantir segurança na experimentação clínica. Na leishmaniose cutânea, modelos usando o camundongo isogênico BALB / c e o hamster dourado infectados com inóculos elevados de *Leishmania spp.* têm sido amplamente utilizados e estão consagrados como úteis para testar a eficácia de potenciais drogas anti-*Leishmania*. (CARIDHA *et al.*, 2019)

A seguir serão apresentadas as evidências reunidas nos últimos anos, com estudos pré-clínicos já realizados por nosso grupo de pesquisa, que embasaram as proposições dos grupos de comparação e das doses terapêuticas a serem usados no presente trabalho.

A eficácia do antimoniato de meglumina por via intramuscular em doses elevadas (100 e 200 mg Sb<sup>v</sup>/kg/dia, durante 20 dias consecutivos) foi avaliada por DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, (2015), que revelou taxa de cura de 100% a partir do 14 dia de tratamento, em animais infectado com *L. (V.) braziliensis*.

Por sua vez, o mesmo antimoniato de meglumina foi também avaliado por infiltração intralesional em diferentes intervalos de administração (semanal, quinzenal e infiltração única, tempo total de observação de 56 dias). Em síntese, concluiu-se que a infiltração intralesional semanal ou quinzenal foi o esquema mais eficaz no tratamento de animais infectados por *L. (V.) braziliensis* e que a administração única, apesar de levar à redução do tamanho das úlceras de pele, não foi capaz de eliminar os parasitas da lesão (ALVES, 2018).

A eficácia da anfotericina B lipossomal também foi avaliada em modelo animal infectado com *L. (V.) braziliensis*, em dois esquemas de tratamento (dose única 10mg/kg e 2mg/kg/dia em 5 dias consecutivos). Observou-se que anfotericina B lipossomal por via intraperitoneal em dose única possui a mesma eficácia em relação à mesma dose total de 10mg/Kg, mas dividida e administrada em cinco dias consecutivos (ALVES, 2018).

Por fim, estudo prévio em modelo animal infectado com *L. (V.) braziliensis*, a miltefosina oral não levou a cicatrização da lesão em nenhuma das doses testadas, no entanto, causou redução da concentração do parasita no fígado com a dose de 25mg/kg/dia (DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Já em relação às combinações, utilizando hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*, esquema baseado na combinação de doses baixas de antimoniato de meglumina por via intraperitoneal (50 mg Sb<sup>v</sup>/kg/dia por 20 dias consecutivos) com miltefosina oral

(25 mg/kg/dia por 10 dias alternados) foi superior à miltefosina em monoterapia (DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2015). Por fim, também utilizando hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*, taxa de cura de 100% foi observada com a combinação de antimoniato de meglumina intralesional com a anfotericina B lipossomal 10 mg/kg, ambos em administração em dose única, o que foi superior às taxas de cura de 50% e 25%, respectivamente para anfotericina B lipossomal e antimoniato de meglumina isoladamente (ALVES, 2018).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de estudo

Estudo experimental em modelo animal de leishmaniose cutânea utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos infectados por cepa de referência *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

### 4.2 Medicamentos

Foram avaliados neste estudo:

- anfotericina B lipossomal (AmBisome® 50mg/frasco - Gilead Sciences/Estados Unidos da América lote:042497AA e 013827);
- miltefosina (Impavido® 50mg/cápsula - Knight Theraps/Alemanha lote: 6L4010);
- antimoniato de meglumina (Glucantime® 81 mg/mL- Sanofi Medley Farmacêutica Ltda/Brasil lote: 844518).

### 4.3 Ensaios experimentais

#### 4.3.1 Infecção dos animais

A infecção dos animais foi realizada com injeção subcutânea de suspensão de  $1 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  de promastigotas metacíclicas obtidas de cultura de *L. (V.) braziliensis*. A injeção era realizada na base da cauda de hamsters previamente anestesiados e tricotomizados. Após aparecimento das lesões no tegumento dos animais, o que se dava entre 35 e 40 dias, foram realizados os ensaios simultâneos em grupos de animais submetidos à intervenção terapêutica de interesse e seus respectivos controles.

#### 4.3.2 Estudo para definição de dose ótima da miltefosina

Com o objetivo de avaliar a dose de miltefosina a ser utilizada nos estudos de combinação, inicialmente foi conduzido um estudo com 15 animais, divididos em três grupos de 5 animais submetidos às seguintes intervenções:

- **miltefosina 25mg/kg, via oral, por 20 dias consecutivos:** 200 microlitros de uma solução aquosa de miltefosina de 15 mg/mL (equivalente a 25mg/kg de miltefosina), administrados por gavagem, uma vez por dia, por 20 dias consecutivos;
- **miltefosina 50mg/kg, via oral, por 20 dias consecutivos:** 200 microlitros de uma solução aquosa de miltefosina de 30 mg/mL (equivalente a 50mg/kg de miltefosina), administrados por gavagem, uma vez por dia, por 20 dias consecutivos;
- **controle:** 200 microlitros de água, administrados por gavagem, uma vez por dia, por 20 dias consecutivos;

#### **4.3.3 Experimentos com combinações binárias envolvendo miltefosina, antimoniato de meglumina e anfotericina B lipossomal**

A dose ideal de miltefosina para uso em combinação foi definida em 25mg/kg. As doses ótimas dos demais medicamentos foram definidos em estudos prévios (ALVES *et al*, 2018).

Os experimentos com combinação binárias envolvendo miltefosina, antimoniato de meglumina e anfotericina B lipossomal foi conduzido com 49 animais, divididos em 7 grupos de 7 animais submetidos às seguintes intervenções, descritas a seguir:

- miltefosina, 25 mg por kg, via oral, por 20 dias consecutivos associada a anfotericina B lipossomal 10mg por Kg, dose única, via intraperitoneal, administrada no primeiro dia de tratamento;
- miltefosina, 25 mg por kg, via oral, por 20 dias consecutivos associado a antimoniato de meglumina via intralesional, infiltração única, administrado no primeiro dia de tratamento;

- anfotericina B lipossomal 10mg por kg, dose única, via intraperitoneal, associada a antimoniato de meglumina, via intralesional, infiltração única, administrado no primeiro dia de tratamento;
- anfotericina B lipossomal 10mg por kg, dose única, via intraperitoneal;
- antimoniato de meglumina via intralesional, infiltração única, administrado no primeiro dia de tratamento;
- miltefosina, 25 mg por kg, via oral, por 20 dias consecutivos;
- controle sem tratamento.

Neste estudo, o primeiro dia de administração do tratamento era considerado como D1, a partir de quando todos os outros desfechos eram planejados.

#### **4.3.4 Avaliação de eficácia clínica**

A eficácia clínica foi avaliada por dois critérios:

1. Maior diâmetro da úlcera no dia da eutanásia (23<sup>o</sup> dia após início do tratamento);
2. Magnitude da alteração no tamanho da úlcera, que foi definida pela razão do maior diâmetro da úlcera medido no dia da eutanásia (23<sup>o</sup> dia após início do tratamento ou D23) em relação ao maior diâmetro da úlcera medido no primeiro dia do tratamento (D1).

#### **4.3.5 Avaliação da eficácia parasitológica**

A eficácia parasitológica foi avaliada pela comparação da carga parasitária estimada na lesão e no baço entre os grupos de animais submetidos a diferentes intervenções, sendo calculada pela técnica da diluição limitante. Após eutanásia em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), todos os animais tiveram baço e lesão de pele removidos. O baço era colocado em um tubo Falcon estéril contendo 3 mL de meio de cultura Schneider pH 7,2 não suplementado, e a lesão de pele de cada animal em um tubo Falcon estéril contendo 5 mL do mesmo meio de cultura. As amostras eram pesadas e homogeneizadas em Ultra-Turrax® (IKA, Germany). Em seguida, o material era centrifugado a 1620 g (no caso da lesão) ou 45g (no caso do processamento do baço),

por dois minutos para sedimentação. O sobrenadante era separado e centrifugado a 1700 g por 15 minutos (lesão) ou 1620 g por dois minutos (baço). O pellet formado era ressuspendido em 1 mL de meio Schneider pH 7,2 suplementado com soro bovino fetal inativado a 56° C por 30 minutos, acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. A diluição era realizada em triplicata (1:10) em cultivos sucessivos em placas estéreis de 96 poços, que foram incubadas a 26°C por seis dias. Cada poço era examinado em microscópio de inversão (Olympus CK30) para avaliar a presença de parasitas viáveis. A carga de parasitas foi determinada a partir da maior diluição em que parasitas móveis eram observados. (TITUS *et al.*, 1985)

#### **4.3.6 Avaliação de toxicidade**

A análise da toxicidade relacionada aos tratamentos foi avaliada por meio da inspeção dos animais e mensuração da massa corpórea, desde o primeiro dia do tratamento, semanalmente até o dia da eutanásia dos animais, no 23° após o início do tratamento (D1, D7, D14 e D23).

#### **4.3.7 Análise dos dados**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8 for Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Os dados obtidos para carga parasitária (transformados em Log+1) e do maior diâmetro da úlcera foram avaliados quanto ao padrão de distribuição pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (KS), D'Agostino & Pearson ou Shapiro-Wilk.

A estratégia de análise consistiu na comparação entre os grupos com as diferentes intervenções em relação aos parâmetros clínico e parasitológico. Em relação à resposta clínica, além do gráfico com a evolução da medida das lesões ao longo do tempo, foi também avaliada a magnitude de alteração do tamanho da lesão, calculada pela razão do maior diâmetro da úlcera no dia da eutanásia em relação ao maior diâmetro da úlcera medido em D1. Já a resposta parasitológica foi avaliada comparando-se a carga de parasitária de *L. (V.) braziliensis* no tecido ao final do tratamento, entre os vários grupos de animais.

As comparações foram realizadas por testes de hipóteses paramétricos e não paramétricos. As variáveis contínuas de distribuição normal foram apresentadas como médias e desvio padrão (DP) e a comparação de médias foi realizada utilizando o teste “t” de *Student* para dois grupos e análise de variância (ANOVA), para mais de dois grupos. Variáveis contínuas de distribuição não normal foram apresentadas como medianas seguidas da variação interquartil 25% e 75% (IQR 25%-75%). As comparações de medianas foram realizadas utilizando o teste U de Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis, para três ou mais grupos. Para todas as comparações, o nível de significância considerado foi de 5%.

#### **4.3.8 Aspectos Éticos**

O uso de animais neste projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (CEUA-Fiocruz), licença LW-4/20. (Anexo A)

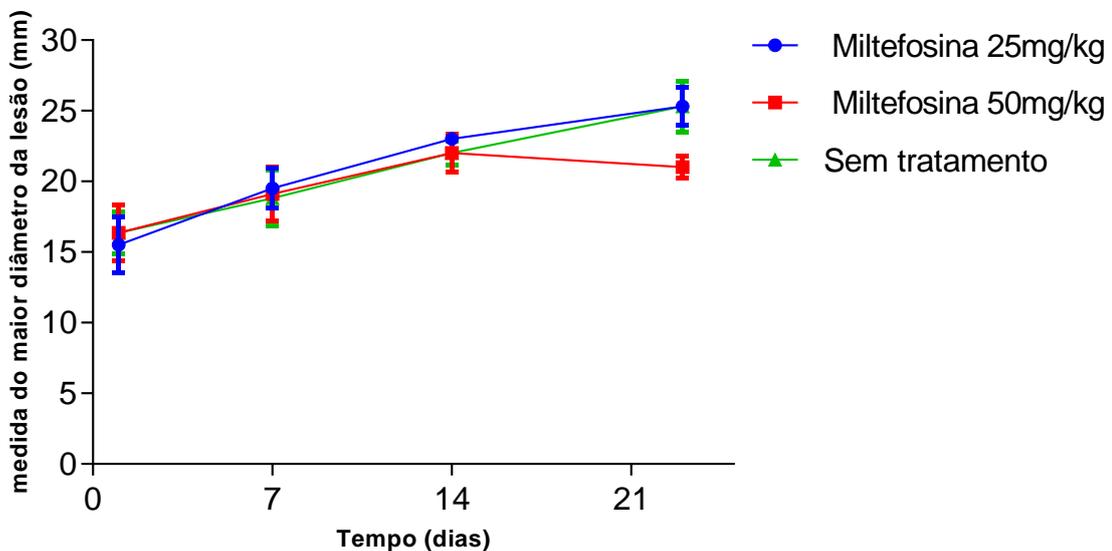
## 5. RESULTADOS

### 5.1.1 Estudo para definição de dose ideal da miltefosina

#### 5.1.1.1 Eficácia clínica

Foram comparadas duas doses de miltefosina, sendo a resposta clínica avaliada pela média do maior diâmetro da úlcera ao longo do tempo de tratamento conforme apresentado no GRÁFICO 1. Houve aumento do tamanho das lesões dos hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* nos três grupos avaliados (TABELA 2), sem diferença significativa entre eles (QUADRO 1). As medidas da lesão de cada animal nos diferentes grupos são apresentadas no APÊNDICE A.

**GRÁFICO 1** – Evolução do tamanho médio das lesões de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* submetidos a diferentes tratamentos com miltefosina em relação ao controle



**LEGENDA:** Tamanho médio das lesões (mm) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=5) infectados na base da cauda com 200  $\mu$ L de suspensão de promastigota de *L. (V.) braziliensis* e tratados com miltefosina 25mg/kg e 50mg/kg, administrado via oral, uma vez por dia, durante 20 dias consecutivos. As lesões foram medidas a cada sete dias e os animais sofreram eutanásia 23 dias após o início do tratamento. As barras verticais representam o desvio-padrão da média do maior diâmetro das lesões de cada grupo. **FONTE:** Elaborado pelo autor.

**QUADRO 1** - Significância (valor de p) da comparação do tamanho das lesões no dia da eutanásia entre grupos de animais submetidos a diferentes intervenções

Esquemas de tratamento	Miltefosina 25mg/kg	Miltefosina 50mg/kg
Miltefosina 50mg/kg	0,0393	
Controle	0,9864	0,0887

FONTE: Elaborado pelo autor.

**TABELA 2** – Mediana da magnitude (IRQ25-75%) da variação no tamanho da lesão de acordo com intervenção

Intervenção	Magnitude da variação da lesão definida por D23/D1 (IQR25-75%)
Miltefosina 25mg/kg	1,469 (1,276 – 2,431)
Miltefosina 50mg/kg	1,492 (1,077 – 1,695)
Controle	1,495 (1,331 – 1,950)

FONTE: Elaborado pelo autor.

**QUADRO 2** - Significância (valor de p) da comparação da magnitude da variação no tamanho da lesão ao longo do tratamento entre grupos submetidos a diferentes intervenções

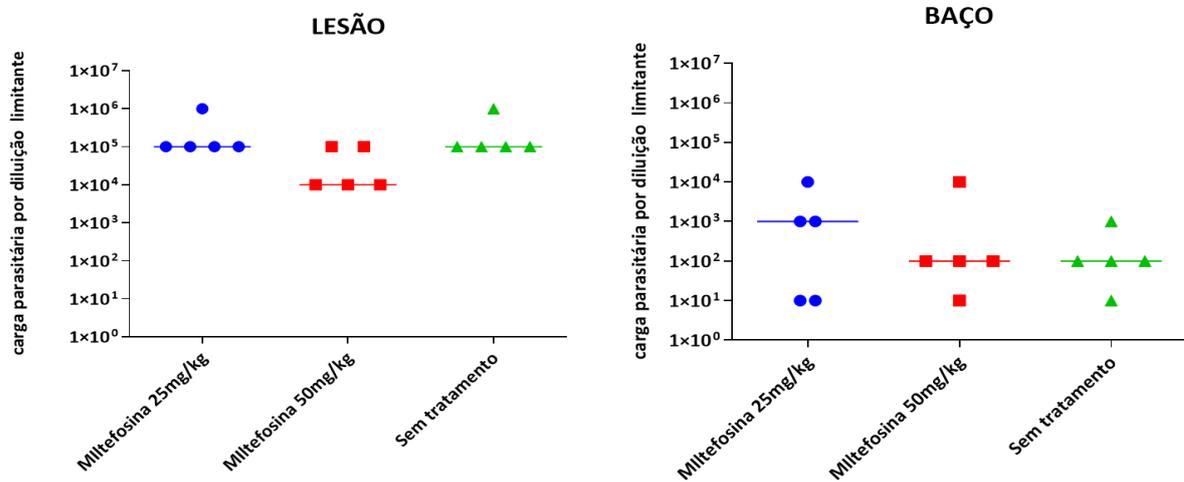
Esquemas de tratamento	Miltefosina 25mg/kg	Miltefosina 50mg/kg
Miltefosina 50mg/kg	0,5556	
Controle	0,8413	0,9048

LEGENDA: Magnitude da variação definida pela razão entre o maior diâmetro da lesão em D23 em relação ao maior diâmetro em D1 FONTE: Elaborado pelo autor.

### 5.1.1.2 Eficácia parasitológica

No GRÁFICO 2 são apresentadas as estimativas de carga parasitária na lesão e no baço dos hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* nos três grupos avaliados, submetidos a duas doses de miltefosina por gavagem ou nenhum tratamento (controle).

**GRÁFICO 2** - Estimativa da carga parasitária na lesão e no baço de hamsters infectados por *L. (V.) braziliensis* submetidos a diferentes intervenções



**LEGENDA:** Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=5) infectados na base da cauda com 200  $\mu$ L de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e tratados com dois esquemas de miltefosina, administrada por gavagem diariamente, durante 20 dias consecutivos ou nenhum tratamento. A estimativa do número de parasitas foi determinada por meio da técnica de diluição limitante realizada no dia da eutanásia dos animais (23 dias após o início do tratamento). As barras horizontais representam a mediana de parasitas viáveis no baço ou na lesão para cada grupo. **FONTE:** Elaborado pelo autor

Na avaliação da eficácia parasitológica não houve diferença significativa entre os grupos de animais tratados e o grupo controle na comparação da carga parasitária em baço (TABELA 3 e QUADRO 3) e lesão de pele (TABELA 4 e QUADRO 4).

**TABELA 3** – Carga parasitária para *L. braziliensis* (média e desvio padrão) em baço de animais submetidos a diferentes intervenções

	Miltefosina 25mg/kg	Miltefosina 50mg/kg	Controle
<b>Baço</b>	2,416 $\pm$ 1,321	2,208 $\pm$ 1,085	2,008 $\pm$ 0,693

**FONTE:** Elaborado pelo autor.

**QUADRO 3** - Significância (valor de p) para comparação da carga parasitária em baço de animais submetidos a diferentes intervenções

Esquemas de tratamento	Miltefosina 25mg/kg	Miltefosina 50mg/kg
<b>Miltefosina 50mg/kg</b>	0,7924	
<b>Controle</b>	0,5577	0,7372

**FONTE:** Elaborado pelo autor.

**TABELA 4** - Carga parasitária para *L. braziliensis* (mediana e IQR25-75%) na lesão de pele de animais submetidos a diferentes intervenções

	Miltefosina 25mg/kg	Miltefosina 50mg/kg	Controle
<b>Lesão</b>	5,00 (5,00 - 5,50)	4,00 (4,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,50)

**LEGENDA:** Carga parasitária estimada por diluição limitante IQR25-75%: intervalo interquartil 25-75%

**FONTE:** Elaborado pelo autor.

**QUADRO 4** - Significância (valor de p) para a comparação entre carga parasitária em lesão de animais submetidos a diferentes intervenções

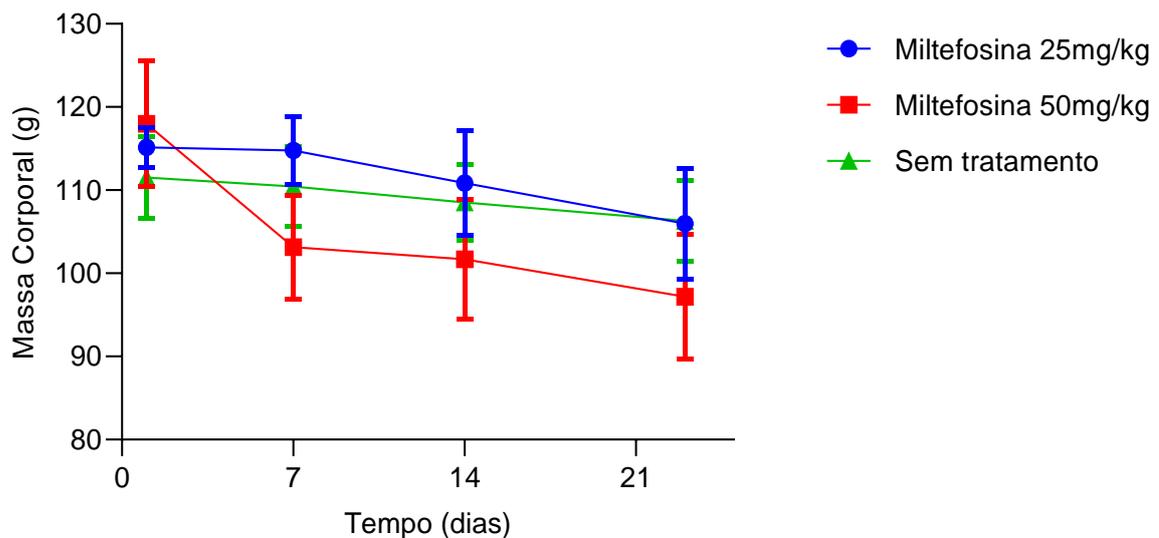
Esquemas de tratamento	Miltefosina 25mg/kg	Miltefosina 50mg/kg
Miltefosina 50mg/kg	0,1190	
Controle	>0,9999	0,1190

**FONTE:** Elaborado pelo autor.

### 5.1.1.3 Toxicidade

O GRÁFICO 3 apresenta a evolução da massa corporal para cada grupo de animais, de acordo com a intervenção. Não foi observada alteração no comportamento ou aparência dos animais ao longo do tratamento.

**GRÁFICO 3** - Evolução da massa corporal dos animais, ao longo do tratamento, de acordo com a intervenção



**FONTE:** Elaborado pelo autor.

**QUADRO 5** - Significância (valor de p) da comparação da massa corporal em D23, entre animais submetidos às diferentes intervenções

Esquemas de tratamento	Miltefosina 25mg/kg	Miltefosina 50mg/kg
Miltefosina 50mg/kg	0,5556	
Controle	0,8413	0,7302

FONTE: Elaborado pelo autor.

**TABELA 5** – Magnitude da variação da massa corporal dos animais ao longo do tratamento, em relação ao peso em D1, nos diferentes grupos de intervenção

Momento de avaliação	Miltefosina 25mg/kg	Miltefosina 50mg/kg	Controle
D7	0,997 ± 0,062	0,877 ± 0,054	0,992 ± 0,049
D14	0,961 ± 0,102	0,861 ± 0,030	0,975 ± 0,058
D23	0,919 ± 0,111	0,793 ± 0,023	0,955 ± 0,056

**LEGENDA:** magnitude definida como a razão da massa corporal em cada momento/massa corporal em D1, apresentado como média do grupo ± desvio padrão **FONTE:** Elaborado pelo autor.

**QUADRO 6** - Significância (valor de p) da comparação entre a magnitude da variação da massa corporal em D23 nos diferentes grupos de intervenção

Esquemas de tratamento	Miltefosina 25mg/kg	Miltefosina 50mg/kg
Miltefosina 50mg/kg	0,0633	
Controle	0,5388	0,0011

**LEGENDA:** magnitude definida como a razão massa corporal em D23/massa corporal em D1, apresentado como média do grupo ± desvio padrão **FONTE:** Elaborado pelo autor.

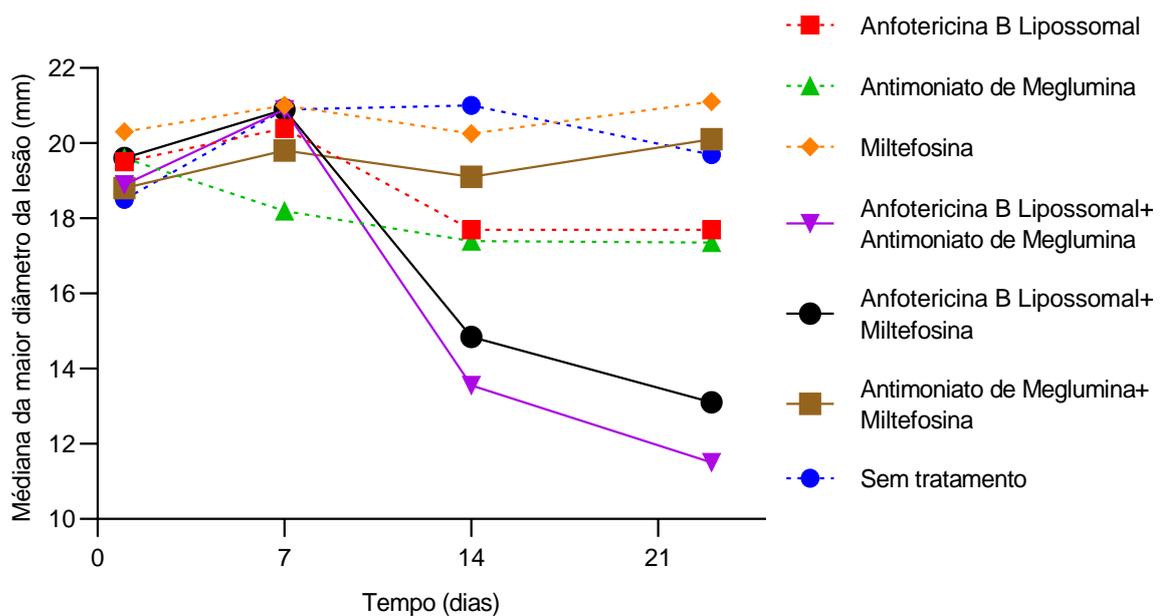
Apesar de não haver diferença estatística no peso médio dos grupos de animais em D23 (QUADRO 5), a magnitude da variação do peso em relação a D1 no grupo tratado com miltefosina 50mg/Kg (em torno de 21%) foi significativamente maior em relação ao grupo tratado com dose de 25mg/kg, sugerindo uma maior toxicidade desta intervenção em relação à dose menor (TABELA 5 e QUADRO 6), sem acréscimo em eficácia. Portanto a dose definida para ser utilizada no estudo de combinação foi de 25mg/kg.

## 5.1.2 Experimentos com combinações binárias envolvendo miltefosina, antimoniato de meglumina e anfotericina B lipossomal

### 5.1.2.1 Eficácia clínica

A resposta clínica avaliada pela medida do maior diâmetro da úlcera ao longo do tempo de tratamento para diferentes intervenções é apresentada no GRÁFICO 4. A evolução da medida da lesão de cada animal nos diferentes grupos pode ser visualizada no APÊNDICE B.

**GRÁFICO 4** – Mediana do maior diâmetro da lesão, ao longo do tratamento, nos diferentes grupos de animais de acordo com a intervenção terapêutica



**LEGENDA:** Evolução do tamanho das lesões (maior diâmetro da úlcera, mediana do grupo em mm) de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=7) infectados na base da cauda com 200  $\mu$ L de suspensão de promastigota de *L. (V.) braziliensis*. **FONTE:** Elaborado pelo autor

Na TABELA 6 são apresentadas as medianas do maior diâmetro da úlcera dos grupos de animais submetidos às diferentes intervenções, ao longo do tratamento e, no QUADRO 7, a significância estatística das comparações.

**TABELA 6 – Mediana do tamanho da lesão (IQR25-75%) ao longo do tratamento de acordo com a intervenção**

Esquemas de tratamento	D1	D7	D14	D23
Anfotericina B lipossomal	19,5 (16,4 - 22,0)	20,4 (17,2 - 23,0)	17,7 (15,0 - 19,3)	17,7 (11,9 - 20,3)
Antimoniato de meglumina	19,6 (16,1 - 21,3)	18,2 (16,9 - 21,2)	17,4 (10,4 - 18,4)	17,4 (13,5 - 18,0)
Anfotericina B lipossomal + antimoniato de meglumina	18,9 (16,5 - 21,8)	20,9 (15,9 - 21,9)	13,6 (9,5 - 16,3)	11,5 (6,3 - 17,0)
Miltefosina	20,3 (17,5 - 21,3)	21,0 (18,0 - 24,2)	20,3 (19,5 - 23,0)	21,1 (18,8 - 21,6)
Anfotericina B lipossomal + miltefosina	19,6 (17,2 - 22,6)	20,9 (17,8 - 21,9)	14,9 (11,4 - 17,2)	13,1 (8,4 - 17,0)
Miltefosina + antimoniato de meglumina	18,8 (17,6 - 21,6)	19,8 (18,1 - 21,2)	19,1 (17,0 - 20,7)	20,1 (16,6 - 21,5)
Controle	18,5 (17,4 - 19,5)	20,9 (18,2 - 22,4)	21,0 (17,9 - 22,2)	19,7 (18,4 - 22,2)

**LEGENDA:** Tamanho da lesão apresentado pela medida do maior diâmetro da úlcera (mediana do grupo em mm) IQR: intervalo interquartil 25-75%. D1: primeiro dia de tratamento D7: sétimo dia de tratamento D14: décimo quarto dia do tratamento D23: vigésimo dia a partir do início do tratamento e dia da eutanásia. **FONTE:** Elaborado pelo autor.

**QUADRO 7 - Significância (valor de p) para a comparação do tamanho das lesões entre grupos em D23, de acordo com a intervenção (complementa TABELA 6)**

Esquemas de tratamento	AnfLip	Glu IL	AnfLip +Glu IL	Milt	AnfLip + Milt	Milt +Glu IL
Glu IL	0,7308					
AnfLip +Glu IL	0,1807	0,1320				
Milt 25mg/kg	0,1490	<b>0,0346</b>	0,0519			
AnfLip + Milt	0,1807	0,2403	0,8182	<b>0,0087</b>		
Milt +Glu IL	0,3152	0,1143	0,0667	0,5556	<b>0,0381</b>	
Controle	0,1754	<b>0,0140</b>	<b>0,0221</b>	0,6389	<b>0,0140</b>	0,9273

**LEGENDA:** AnfLip: anfotericina B lipossomal intraperitoneal, Glu IL: antimoniato de meglumina intralesional, AnfLip + Glu IL: anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado antimoniato de meglumina intralesional, Milt: miltefosina oral, AnfLip + Milt: anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado a miltefosina oral, Milt + Glu IL: miltefosina oral associado a antimoniato de meglumina intralesional **FONTE:** Elaborado pelo autor.

Diferença significativa foi observada entre os grupos tratados com antimoniato de meglumina intralesional, anfotericina B lipossomal associado a antimoniato de meglumina e anfotericina B lipossomal associado com miltefosina em relação ao

grupo sem tratamento (controle). Na comparação entre as intervenções terapêuticas, tanto a infiltração intralesional de antimoniato de meglumina quanto a associação anfotericina B lipossomal e miltefosina foram superiores em relação à miltefosina em monoterapia. Em relação às combinações com miltefosina, o uso com anfotericina B lipossomal foi superior em relação ao uso associado com antimoniato de meglumina por via intralesional. (QUADRO 7)

**TABELA 7 –** Magnitude da variação no tamanho da lesão (média e desvio padrão) ao fim do tratamento de acordo com intervenção

<i>Intervenção</i>	<i>Magnitude média da variação da lesão (D23/D1) e desvio padrão</i>
<b>Anfotericina B lipossomal</b>	0,906 ± 0,267
<b>Antimoniato de meglumina</b>	0,868 ± 0,170
<b>Anfotericina B lipossomal + antimoniato de meglumina</b>	0,621 ± 0,335
<b>Miltefosina</b>	1,171 ± 0,373
<b>Anfotericina B lipossomal + miltefosina</b>	0,650 ± 0,276
<b>Miltefosina + antimoniato de meglumina</b>	0,956 ± 0,167
<b>Controle</b>	1,068 ± 0,130

**LEGENDA:** Magnitude da variação foi determinada pela razão entre maior diâmetro da úlcera no dia da eutanásia (D23) e o maior diâmetro da úlcera em D1 **FONTE:** Elaborado pelo autor.

**QUADRO 8 -** Significância (valor de p) da comparação entre a magnitude da variação da medida da lesão ao longo do tratamento (D23/D1) de acordo com a intervenção (complementa TABELA 7)

<b>Esquemas de tratamento</b>	<b>AnfLip</b>	<b>Glu IL</b>	<b>AnfLip + Glu IL</b>	<b>Milt</b>	<b>AnfLip + Milt</b>	<b>Milt + Glu IL</b>
<b>Glu IL</b>	0,7701					
<b>AnfLip +Glu IL</b>	0,1157	0,1387				
<b>Milt</b>	0,1781	0,1055	<b>0,0296</b>			
<b>AnfLip + Milt</b>	0,1181	0,1311	0,8710	<b>0,0256</b>		
<b>Milt +Glu IL</b>	0,7450	0,4424	0,0847	0,3222	0,0847	
<b>Controle</b>	0,1737	<b>0,0348</b>	<b>0,0074</b>	0,5051	<b>0,0042</b>	0,2429

**LEGENDA:** Magnitude da variação foi determinada pelo quociente maior diâmetro da úlcera ao fim da observação (D23) em relação maior diâmetro da úlcera em D1 **AnfLip:** anfotericina B lipossomal intraperitoneal, **Glu IL:** antimoniato de meglumina intralesional, **AnfLip + Glu IL:** anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado antimoniato de meglumina intralesional, **Milt:** miltefosina oral, **AnfLip + Milt:** anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado a miltefosina oral, **Milt + Glu IL:** miltefosina oral associado a antimoniato de meglumina intralesional **FONTE:** Elaborado pelo autor.

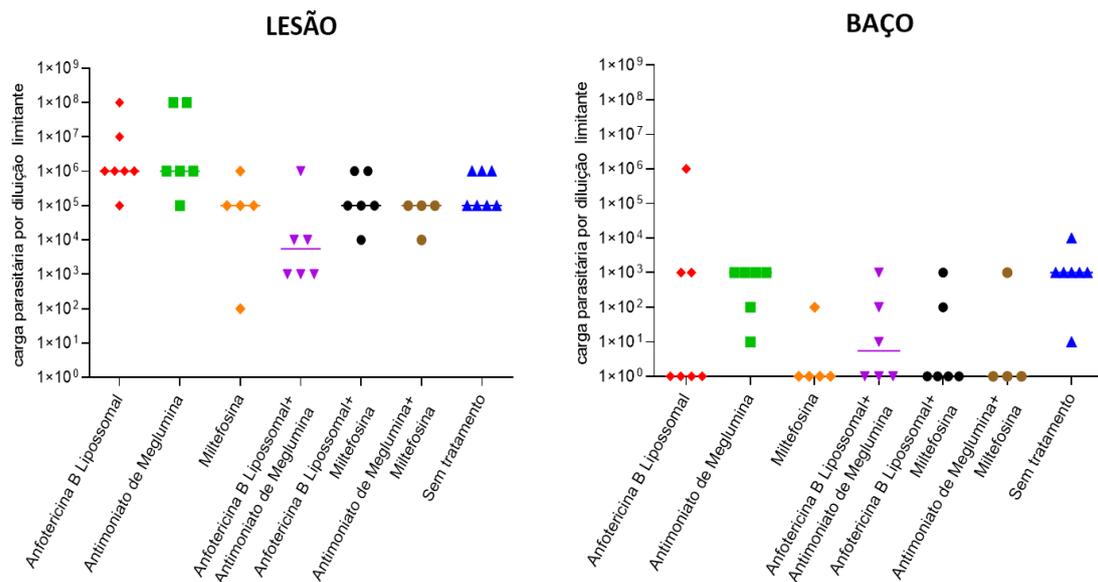
Apresentaram maior redução do tamanho da lesão em relação ao controle, animais tratados com antimoniato de meglumina em infiltração intralesional em monoterapia, anfotericina B lipossomal associada a miltefosina e anfotericina B lipossomal

associada a antimoniato de meglumina. Na comparação entre as intervenções terapêuticas, apresentaram maior redução na lesão em relação ao grupo tratado com miltefosina monoterapia, grupos de animais tratados com as combinações de anfotericina B e antimoniato de meglumina e anfotericina B e miltefosina. (QUADRO 8)

### 5.1.2.2 Eficácia parasitológica

A estimativa da carga parasitária na lesão de pele e no baço de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*, submetidos aos diferentes esquemas terapêuticos, é apresentada no GRÁFICO 5.

**GRÁFICO 5** - Estimativa da carga parasitária na lesão e no baço de hamsters infectados por *L. (V.) braziliensis* e tratados com diferentes intervenções terapêuticas



**LEGENDA:** Parasitas viáveis na lesão e baço de hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos (n=7) infectados na base da cauda com 200 µL de suspensão de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. A estimativa do número de parasitas foi feita por técnica de diluição limitante. Fragmento de pele e baço extraídos no 23º dia após início do tratamento (dia da eutanásia). **FONTE:** Elaborado pelo autor.

**QUADRO 9** - Significância (valor de p) da comparação entre carga parasitária na lesão entre subgrupos de animais submetidos a diferentes intervenções terapêuticas

Esquemas de tratamento	AnfLip	Glu IL	AnfLip + Glu IL	Milt	AnfLip + Milt	Milt + Glu IL
Glu IL	0,8287					
AnfLip +Glu IL	<b>0,0012</b>	<b>0,0022</b>				
Milt	<b>0,0391</b>	<b>0,0455</b>	0,0671			
AnfLip + Milt	0,0519	0,1017	<b>0,0065</b>	0,6364		
Milt +Glu IL	<b>0,0121</b>	<b>0,0333</b>	<b>0,0190</b>	0,8810	0,6381	
Controle	0,1224	0,1224	<b>0,0006</b>	0,3636	0,6737	0,1273

**LEGENDA:** AnfLip: anfotericina B lipossomal intraperitoneal, Glu IL: antimoniato de meglumina intralesional, AnfLip + Glu IL: anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado antimoniato de meglumina intralesional, Milt: miltefosina oral, AnfLip + Milt: anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado a miltefosina oral, Milt + Glu IL: miltefosina oral associado a antimoniato de meglumina intralesional **FONTE:** Elaborado pelo autor.

**Animais tratados com anfotericina B lipossomal associada a antimoniato de meglumina por infiltração intralesional apresentaram a maior redução na carga parasitária na lesão, significativamente diferente de todos os outros grupos, exceto aquele tratado com miltefosina em monoterapia, provavelmente em função da grande variação interna na estimativa da carga neste último grupo. Por sua vez, os tratamentos com miltefosina, seja em monoterapia ou em associação com antimoniato de meglumina por infiltração intralesional, também se relacionaram com redução significativa da carga parasitária em relação aos grupos de animais tratados com anfotericina B lipossomal e antimoniato de meglumina, ambos em monoterapia (**

QUADRO 9).

No baço, verificou-se que todos os grupos de animais tratados com combinação de medicamentos, assim como o grupo tratado com miltefosina, apresentaram redução significativa da carga parasitária em comparação com animais sem tratamento (controle). Observou-se ainda que animais tratados com antimoniato de meglumina por infiltração intralesional apresentaram carga parasitária no baço significativamente mais elevada em relação aos animais tratados com miltefosina e anfotericina B lipossomal associada a miltefosina. (QUADRO 10)

**QUADRO 10** - Significância (valor de p) para comparação da carga parasitária no baço entre subgrupos de animais submetidos a diferentes intervenções terapêuticas

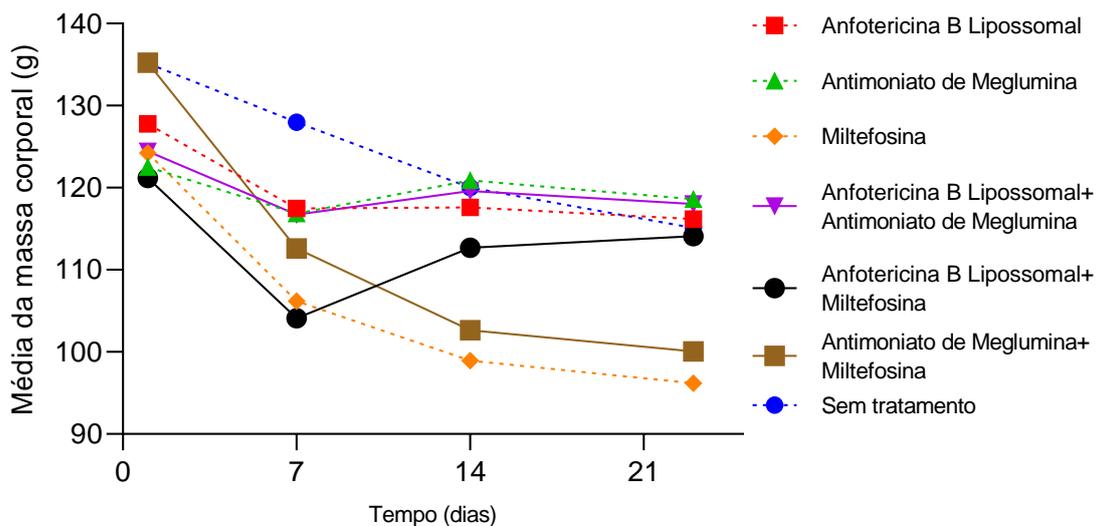
Esquemas de tratamento	AnfLip	Glu IL	AnfLip + Glu IL	Milt	AnfLip + Milt	Milt + Glu IL
Glu IL	0,3648					
AnfLip +Glu IL	0,8572	0,0693				
Milt	0,3106	<b>0,0108</b>	0,4697			
AnfLip + Milt	0,6166	<b>0,0476</b>	0,9242	0,8485		
Milt +Glu IL	0,7030	0,0714	0,7857	0,7222	>0,9999	
Controle	0,1474	0,4860	<b>0,0146</b>	<b>0,0025</b>	<b>0,0111</b>	<b>0,0212</b>

**LEGENDA:** AnfLip: anfotericina B lipossomal intraperitoneal, Glu IL: antimoniato de meglumina intralesional, AnfLip + Glu IL: anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado antimoniato de meglumina intralesional, Milt: miltefosina oral, AnfLip + Milt: anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado a miltefosina oral, Milt + Glu IL: miltefosina oral associado a antimoniato de meglumina intralesional **FONTE:** Elaborado pelo autor.

### 5.1.2.3 Toxicidade

O GRÁFICO 6 apresenta a média da massa corporal dos animais submetidos às diferentes intervenções terapêuticas ao longo do tempo. O peso de cada animal em todos os momentos a partir de D1 são apresentados no APÊNDICE C.

**GRÁFICO 6** - Evolução da massa corporal dos animais, ao longo do tempo, de acordo com a intervenção



**LEGENDA:** Massa corporal dos animais, medida em gramas, semanalmente. AnfLip: anfotericina B lipossomal intraperitoneal, Glu IL: antimoniato de meglumina intralesional, **FONTE:** Elaborado pelo autor

Os animais tratados com miltefosina em monoterapia apresentaram uma redução da massa corpórea superior aos demais grupos, exceto em relação ao grupo tratado com miltefosina associado ao antimoniato de meglumina intralesional. Foi observada diferença significativa também na redução da massa corpórea dos animais tratados com miltefosina associada a antimoniato de meglumina em relação aos animais tratados com antimoniato de meglumina monoterapia e com anfotericina B associada a antimoniato de meglumina.

**QUADRO 11** – Significância da comparação entre a média de massa corporal de grupos de animais submetidos a diferentes intervenções em D23

Esquemas de tratamento	AnfLip	Glu IL	AnfLip + Glu IL	Milt	AnfLip + Milt	Milt + Glu IL
Glu IL	0,6721					
AnfLip +Glu IL	0,7675	0,9215				
Milt	<b>0,0029</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0025</b>			
AnfLip + Milt	0,7371	0,4605	0,5541	<b>0,0087</b>		
Milt +Glu IL	0,0456	<b>0,0227</b>	<b>0,0396</b>	0,5242	0,0940	
Controle	0,8333	0,4757	0,5926	<b>0,0009</b>	0,8550	0,0329

**LEGENDA:** AnfLip: anfotericina B lipossomal intraperitoneal, Glu IL: antimoniato de meglumina intralesional, AnfLip + Glu IL: anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado antimoniato de meglumina intralesional, Milt: miltefosina oral, AnfLip + Milt: anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado a miltefosina oral, Milt + Glu IL: miltefosina oral associado a antimoniato de meglumina intralesional **FONTE:** Elaborado pelo autor.

Diferença estatisticamente significativa foi observada na magnitude da variação de peso para os grupos tratados com miltefosina em monoterapia em relação aos grupos tratados com anfotericina B lipossomal intraperitoneal, antimoniato de meglumina intralesional, anfotericina B lipossomal intraperitoneal associada a antimoniato de meglumina intralesional e anfotericina B lipossomal intraperitoneal associada a miltefosina oral. Foi observada diferença significativa também entre o grupo tratado com miltefosina associada a antimoniato de meglumina, em relação aos animais tratados com antimoniato de meglumina e com anfotericina B associada a antimoniato de meglumina e entre o grupo tratado com antimoniato de meglumina e o grupo sem tratamento. (QUADRO 11)

**TABELA 8** – Magnitude da variação da massa corpórea (média e desvio padrão) ao longo do tratamento em grupos de animais submetidos a diferentes intervenções

Esquemas de tratamento	D7	D14	D23
Anfotericina B lipossomal	0,919 ± 0,053	0,920 ± 0,077	0,913 ± 0,094
Antimoniato de meglumina	0,954 ± 0,027	0,975 ± 0,055	0,960 ± 0,095
Anfotericina B lipossomal + antimoniato de meglumina	0,912 ± 0,056	0,938 ± 0,083	0,928 ± 0,118
Miltefosina	0,857 ± 0,027	0,798 ± 0,054	0,786 ± 0,046
Anfotericina B lipossomal + miltefosina	0,857 ± 0,083	0,913 ± 0,054	0,925 ± 0,071
Miltefosina + antimoniato de meglumina	0,834 ± 0,054	0,814 ± 0,097	0,795 ± 0,066
Controle	0,947 ± 0,033	0,890 ± 0,047	0,856 ± 0,062

**LEGENDA:** magnitude da variação da massa corpórea definida pela razão da da massa corpórea em determinado momento/ da massa corpórea em D1 (média do grupo e desvio padrão) **FONTE:** Elaborado pelo autor.

**QUADRO 12** – Significância da comparação entre magnitude da variação da massa corpórea entre grupos submetidos a diferentes intervenções

Esquemas de tratamento	AnfLip	Glu IL	AnfLip + Glu IL	Milt	AnfLip + Milt	Milt + Glu IL
Glu IL	0,3875					
AnfLip +Glu IL	0,7969	0,6200				
Milt	<b>0,0197</b>	<b>0,0047</b>	<b>0,0329</b>			
AnfLip + Milt	0,8001	0,4864	0,9540	<b>0,0046</b>		
Milt +Glu IL	0,0549	<b>0,0170</b>	0,0768	0,8153	<b>0,0195</b>	
Controle	0,2038	<b>0,0367</b>	0,1840	0,0612	0,0881	0,1614

**LEGENDA:** magnitude da variação do peso definida pela razão peso em determinado momento/peso em D1 (média do grupo e desvio padrão) **AnfLip:** anfotericina B lipossomal intraperitoneal, **Glu IL:** antimoniato de meglumina intralesional, **AnfLip + Glu IL:** anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado antimoniato de meglumina intralesional, **Milt:** miltefosina oral, **AnfLip + Milt:** anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado a miltefosina oral, **Milt + Glu IL:** miltefosina oral associado a antimoniato de meglumina intralesional **FONTE:** Elaborado pelo autor.

Ao longo do estudo, houve perda de oito animais, três encontrados mortos e cinco submetidos a eutanásia precoce por detecção de intenso sofrimento. As perdas se distribuíram nos grupos conforme apresentado a seguir:

- antimoniato de meglumina intralesional (1),
- anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado antimoniato de meglumina intralesional (1),
- miltefosina oral (2),
- anfotericina B lipossomal intraperitoneal associado a miltefosina oral (1),

- miltefosina oral asociado a antimonio de meglumina intralesional (3).

## 6. DISCUSSÃO

Uma das contribuições deste estudo foi a comparação de duas doses de miltefosina para o estabelecimento da dose ideal, em termos de eficácia e toxicidade, para o tratamento de leishmaniose por *L. braziliensis* no modelo experimental com hamsters. Apesar do medicamento já se encontrar em uso clínico em vários países do mundo, inclusive no Brasil, estudos pré-clínicos explorando novas abordagens terapêuticas para as leishmanioses incluindo miltefosina continuam indicados, diante da necessidade vigente de se explorar potenciais vantagens de variações nos esquemas posológicos usuais, incluindo o uso de combinações. Para tanto, o estabelecimento das doses, intervalos e duração ideais dos medicamentos nos diferentes modelos animais continuam como uma etapa essencial e insubstituível no desenvolvimento de novos tratamentos.

Estudo prévio de nosso grupo avaliando miltefosina em monoterapia para tratamento de hamsters dourados infectados por *L. (V.) braziliensis* confirmou falha clínica com as doses de 5, 10 e 25mg/kg por via oral em dias alternados por 20 dias, apesar da significativa redução da carga parasitária no baço dos animais com a dose de 25mg/kg (DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2015). No estudo atual, o aumento da dose de miltefosina de 25 para 50 mg/kg/dia não gerou aumento na eficácia clínica, mas resultou em toxicidade visível nos animais. Estas observações confirmam a relativa refratariedade deste modelo experimental de leishmaniose por *L. braziliensis* à miltefosina e sugerem que doses acima de 25mg/kg não devem ser utilizadas. A primeira descrição da ação anti-*Leishmania* da miltefosina em modelo animal data da década de 1980. CROFT *et al.*, (1987) demonstraram em experimentos *in vitro* e *in vivo* que vários alquilfosfocolinas tinham ação contra as formas promastigostas da *L. donovani*. Posteriormente, miltefosina foi testada em animais infectado com *L. donovani* and *L. infantum*, confirmando altas taxas de cura (KUHLENCORD *et al.*, 1992). Anos depois dos estudos focados em leishmaniose visceral, estudos em animais passaram a investigar a resposta da miltefosina para o tratamento da leishmaniose tegumentar, seja com espécies do Novo e do Velho Mundo (FILHO; LUCAS; SAMPAIO, 2008)

Paralelamente, a partir dos resultados pré-clínicos desenvolvidos por *CROFT et al.*, (1987) e *KUHLENCORD et al.*, (1992), os primeiros estudos clínicos com a miltefosina foram realizados na Índia para tratamento da leishmaniose visceral (*CROFT; ENGEL*, 2006), levando ao registro do medicamento em 2002. Por sua vez, os bons resultados da miltefosina para o tratamento da leishmaniose visceral levaram à realização do primeiro estudo clínico para leishmaniose cutânea, em 1999 na Colômbia, com taxa de cura de 94% de pacientes infectados com *L. amazonensis* ou *L. panamensis*, tratados com doses entre 133 e 150 mg/dia por 3 a 4 semanas (*SOTO et al.*, 2001). Anos depois, novo estudo clínico, desta vez na Colômbia e Guatemala e utilizando doses otimizadas de miltefosina (2,5 mg/kg por dia por via oral durante 28 dias), foi realizado, tendo revelado taxa de cura de 91%, na Colômbia, onde *L. panamensis* é prevalente, e de 53% na Guatemala, onde *L. braziliensis* e *L. mexicana* predominam (*SOTO et al.*, 2004). Mais recentemente, estudos no Brasil demonstraram uma taxa de cura de 75% em estudo na Bahia, onde predomina infecção por *L. braziliensis* (*MACHADO et al.*, 2010), e de 71,4% em estudo na região amazônica, onde a maior parte dos casos era por *L. guyanensis* (*CHRUSCIK-TALHARI et al.*, 2011). Essa disparidade nas taxas de cura observadas por diferentes estudos sugere uma variação intrínseca na sensibilidade entre espécies de *Leishmania* e, mesmo para a mesma espécie, entre cepas em diferentes localidades. Um dos mecanismos especulado para explicar esse fenômeno estaria relacionado à etapa de internalização do medicamento pelo parasita, reduzida em algumas cepas (*SÁNCHEZ-CAÑETE et al.*, 2009), daí a importância de se monitorar as taxas de resposta clínica para a miltefosina loco-regionalmente e ao longo do tempo.

Em relação à resposta parasitológica observada com a miltefosina, tal como observado para outros medicamentos, dissociação da resposta clínica é achado frequente nos modelos experimentais para leishmaniose cutânea (*AMER; EISSA; MOSSALLAM*, 2016), da mesma forma como a persistência parasitária já está bem documentada em pacientes tratados e clinicamente curados para a doença (*PAULA*, 2010), não sendo a cura parasitológica compreendida como um parâmetro indispensável da resposta terapêutica. Ainda assim, interessante observar, na comparação entre as intervenções avaliadas neste estudo, que uma delas reduziu significativamente a carga parasitária na lesão, aquela baseada na associação de

anfotericina B lipossomal e antimoniato pentavalente por infiltração intralesional, a mesma que levou à melhor resposta clínica.

A segunda contribuição deste estudo foi a identificação de duas combinações terapêuticas binárias promissoras no tratamento da leishmaniose cutânea em modelo experimental, nomeadamente a anfotericina B lipossomal associada a antimoniato de meglumina por infiltração intralesional e anfotericina B lipossomal associada a miltefosina. Diferentemente do uso das intervenções isoladas, os dois medicamentos combinados produziram significativa redução nas lesões dos animais tratados em comparação com o grupo controle.

A principal vantagem da infiltração intralesional é a administração de dose total de antimoniato de meglumina inferior ao preconizado por via sistêmica, o que reduz a concentração plasmática de antimônio e conseqüentemente sua toxicidade, tornando a monitorização laboratorial dispensável (FERNANDES, 2019). A alta concentração do medicamento no tecido subcutâneo, alcançado pela infiltração direta, é apontada como responsável pela eficácia obtida. As desvantagens da abordagem são a exigência de um profissional treinado para a realização do procedimento, que atualmente é considerado no Brasil um ato médico exclusivo. Outra limitação é ser recomendável estritamente para tratamento de formas clínicas com poucas lesões. Por sua vez, esquema incluindo anfotericina B lipossomal administrada em dose única reduziria a necessidade de internação ou deslocamento diário aos serviços de saúde em comparação com o tratamento convencional, que se baseia no acúmulo de dose ao longo de vários dias. Essa redução nos dias de internação traria impacto direto no custo total do tratamento, independente da redução na dose total utilizada do medicamento, diante da magnitude dos custos relacionados à hospitalização.

Por sua vez, o racional da combinação de anfotericina B lipossomal com miltefosina seria aumentar a taxa de cura alcançada com miltefosina monoterapia, o que poderia ocorrer pelo mecanismo de adição de efeito ou sinergismo, ao mesmo tempo em que se limitaria os custos hospitalares e aqueles decorrentes da monitorização laboratorial exigida pelo esquema convencional pleno com anfotericina B, da mesma forma como hipotetizado com a associação anfotericina B e infiltração intralesional de antimoniato

de meglumina. Trata-se de combinação ainda não previamente avaliada, nem mesmo em estudos pré-clínicos, apesar de se tratar de esquema posológico atrativo pela comodidade da terapia autoadministrada no domicílio.

O presente desenho de estudo não permite a definição do tipo de interação envolvido na combinação de medicamentos. Adição de efeitos é aquele em que o efeito combinado de dois compostos químicos é igual à soma do efeito de cada agente administrado isoladamente, sendo o resultado mais comum observado nas combinações. O sinergismo é aquele em que os efeitos combinados de dois compostos químicos ultrapassam a soma dos efeitos de cada agente administrado isoladamente. (GOODMAN *et al.*, 2006). Estudos adicionais são necessários para definir o tipo de interação existente entre os medicamentos anfotericina B lipossomal e miltefosina, no entanto, é sabido que o mecanismo de ação da anfotericina B favorece a ação da miltefosina, uma vez que aumenta a permeabilidade da membrana celular do parasita, facilitando o acesso da miltefosina ao seu sítio de ação, possibilitando uma maior concentração deste medicamento no interior do parasita. O presente estudo permite concluir que a resposta observada com a combinação é superior a observada com os medicamentos isoladamente.

Já a combinação de miltefosina com o antimoníato de meglumina por infiltração intralésional, além de superior ao controle, foi também mais eficaz em comparação com miltefosina em monoterapia. Esse dado complementa outro obtido anteriormente, no estudo conduzido por DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.* (2015) avaliando a combinação da miltefosina com o antimoníato de meglumina por via sistêmica. Naquele estudo, foi observada redução de 50% das lesões, sem epitelação completa em qualquer dos animais, resposta inferior à observada com a combinação do gel de paromicina com miltefosina, que produziu redução de 71% no tamanho das lesões e epitelação completa das lesões em 50% dos animais.

Do ponto de vista teórico, terapia combinada de miltefosina com outro medicamento com ação anti-*Leishmania* poderia trazer redução das falhas mediada ou não por resistência ao fármaco, especulada em seu uso em monoterapia em vários estudos. Um dos mecanismos facilitadores da resistência seria a meia-vida longa da miltefosina

(aproximadamente 120 h), que leva a níveis sub terapêuticos remanescentes por algumas semanas. Assim, uma interrupção precoce do tratamento devido a uma melhora rápida e aos efeitos adversos gastrointestinais propiciaria um contexto de alto risco para a seleção de resistência à miltefosina. OBONAGA e colaboradores (2014) demonstraram em uma avaliação prospectiva *in vitro* e *in vivo* que a perda de suscetibilidade da *Leishmania (Viannia)* à miltefosina é um dos múltiplos fatores envolvidos na falha do tratamento na leishmaniose cutânea com este medicamento. A instalação de resistência também tem sido explorada para justificar o alto percentual de recidivas entre pacientes com leishmaniose visceral tratados com miltefosina, tal como discutido por RIJAL *et al.*, (2013), em estudo de coorte com 120 pacientes com LV e 20% de recidiva. No mesmo sentido, estudo realizado na Índia com 567 pacientes, uma década após o registro da miltefosina, demonstrava haver aumento substancial na taxa de falha ao medicamento entre casos de LV em comparação com aqueles observados no ensaio clínico original que justificou o seu registro no país.(SUNDAR *et al.*, 2012)

Em relação à toxicidade, esquemas contendo miltefosina foram aqueles que levaram à maior perda de massa corpórea dos animais, superior a observada com todas as outras intervenções e, também, em comparação com os animais não tratados. As observações indicam que tanto a medicação em si quanto a atividade da doença são fatores relacionados à perda ponderal dos animais, o que é sugerido pela aparente redução na magnitude da perda no grupo tratado com anfotericina B lipossomal e miltefosina em relação ao grupo tratado com miltefosina isoladamente, que teve o pior desfecho clínico.

A combinação da anfotericina B lipossomal com antimoniato de meglumina por infiltração intralesional já havia sido avaliada previamente por ALVES (2018), que demonstrou redução de 100% tamanho da lesão em todos os animais tratados. Resultado diferente do observado neste estudo, em que a epitelização plena ocorreu apenas em um animal tratado (16,7%). Diferentemente do procedimento adotado agora, no estudo realizado por ALVES (2018), a infecção dos hamsters foi realizada com formas amastigostas de *L. (V.) braziliensis*, obtidas de fragmentos de lesão de animais previamente infectados. Por sua vez, no presente estudo, formas

promastigotas metacíclicas obtidas de cultura de *L. (V.) braziliensis* foram utilizadas na infecção dos animais, o que aparentemente se relacionou a uma carga parasitária maior e, conseqüentemente, um modelo de infecção mais resistente ao tratamento. Para confirmar a influência da forma infectante na susceptibilidade do modelo experimental, repetimos o experimento com a intervenção combinação de anfotericina lipossomal dose única por via intraperitoneal (10mg/kg) associada com infiltração única intralesional de antimoniato de meglumina em dois grupos de animais, o primeiro infectado por promastigotas metacíclicas e o segundo infectado com suspensão de amastigotas de *L.(V.) braziliensis*. Como resultado, observamos redução de 80% das lesões dos animais infectados com formas amastigotas em comparação com 21,7% de redução no tamanho da lesão no grupo infectado com formas promastigotas, confirmando a influência do procedimento de infecção nos resultados finais aos tratamentos. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esta discrepância. A primeira seria a menor concentração parasitária no macerado tecidual utilizado para infectar os animais por amastigotas, técnica essa com inerente dificuldade de se quantificar a real carga infectante pois usa como fonte da infecção o tecido da lesão de pele retirado de um animal doente. Outra explicação seria diferença na viabilidade da infecção produzida a partir de promastigotas em relação à infecção a partir de amastigotas, considerando que as primeiras são aquelas encontradas no mosquito vetor, o que se aproximaria mais do ciclo de infecção natural.

Especificamente, a infecção utilizando formas promastigotas, o que atende às recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para redução do número de animais necessários para execução dos ensaios, aparentemente leva a uma maior carga parasitária e menor susceptibilidade aos tratamentos. Embora esta observação gere dificuldade na comparação dos atuais resultados com outros obtidos com o modelo de infecção com amastigotas, para a comparação de interesse neste estudo, considerando que todos os grupos de animais foram submetidos ao mesmo procedimento de infecção experimental, nenhum viés ou influência nos resultados da infecção por promastigotas é esperado.

Este trabalho tem inúmeras limitações inerentes aos estudos pré-clínicos. Apesar de utilizarmos o hamster dourado, animal susceptível à infecção por *Leishmania (Vianna)*

*braziliensis* e, portanto, um modelo experimental de infecção com lesões de pele muito similares às observadas em humanos (HOMMEL *et al.*, 1995), a transposição dos resultados exige uma estimativa de equivalência das doses e esquemas posológicos, dificultada pelas diferenças intrínsecas entre a fisiologia de humanos e do hamster, além das diferenças marcantes na história natural da infecção nestes dois hospedeiros. Os controles positivos utilizados no estudo demonstram que o modelo animal e o protocolo de infecção utilizados estão adequados e são capazes de gerar doença (GAMBOA *et al.*, 2008 e GOMES-SILVA *et al.*, 2013). Importante ressaltar, contudo, que as intervenções selecionadas para este experimento tiveram como racional permitir a comparação entre monoterapia e esquemas combinados, e não a comparação com o tratamento de referência para leishmaniose cutânea.

Outro ponto relevante é a limitação amostral pela exigência ética de se reduzir ao máximo a utilização de animais em experimentação científica, o que impede uma avaliação quantitativa livre de vieses e do acaso, ainda mais prejudicada diante da perda dos animais durante o estudo. A não realização de dosagens bioquímicas e estudos de anatomia patológica para a avaliação de toxicidade dos tratamentos também nos impede de apresentar conclusões mais assertivas sobre a aparente intolerância de animais tratados com doses maiores de miltefosina e sobre a causa da morte de animais nos diferentes grupos de intervenção. Estudos de farmacocinética e farmacodinâmica também poderiam agregar informações relevantes sobre a atividade e disponibilidades dos medicamentos, assim como possíveis interações entre os mesmos, o que seria útil para sustentar eventuais modificações nos esquemas posológicos aqui estudados. Este trabalho também revelou que a forma infectante de *Leishmania* altera a magnitude do parasitismo e, por conseguinte, a susceptibilidade do modelo aos tratamentos, o que aponta para a necessidade de harmonização de procedimentos relativos ao modelo experimental em si, incluindo os critérios para avaliação de resposta clínica e parasitológica, com foco na possibilidade de comparação e reunião de resultados observados nos diferentes estudos.

Idealmente, a proposição de um novo esquema terapêutico deveria seguir um plano de desenvolvimento sequencial, tendo como base estudos pré-clínicos, na busca da

reunião do máximo de informações de segurança, eficácia e possíveis interações indesejáveis antes do uso clínico. Neste caso, a abordagem estudada representa uma tentativa de contribuir não com novos fármacos, mas com novos esquemas terapêuticos baseados no reposicionamento posológico de medicações já em uso clínico, mas que em seu uso original apresentam desvantagem logística ou relacionada à toxicidade e custos. A experimentação pré-clínica em animais permite explorar inúmeras possibilidades de combinação, variando doses, intervalos e medicamentos com o intuito de levar à avaliação clínica apenas os esquemas mais promissores e seguros. Avaliando os três medicamentos atualmente disponíveis no Brasil para tratamento da leishmaniose cutânea por *L. braziliensis*, identificamos as combinações de anfotericina B lipossomal em dose única com miltefosina por via oral ou infiltração intralesional de antimoniato de meglumina como esquemas elegíveis para futura avaliação clínica. Por se tratar de medicamentos já registrados e em uso clínico, com eficácia e segurança em uso isolado já avaliadas, uma vez definidos os melhores esquemas posológicos, a etapa seguinte seria a realização de avaliação clínica em pequeno número de pacientes com a leishmaniose, em estudo fase II. As vantagens potenciais destas estratégias seriam o aumento total da eficácia sem a necessidade de internação hospitalar prolongada e, possivelmente, a redução dos custos totais e dos eventos adversos pela redução da carga total recebida de cada um dos medicamentos.

O tratamento da leishmaniose é realizado, atualmente, com um número limitado de medicamentos de alta toxicidade. Nenhuma das alternativas disponíveis reúne eficácia, segurança, facilidade posológica e custo acessível. Apesar destas desvantagens variarem de acordo com o medicamento escolhido, a administração parenteral, a necessidade de internação hospitalar e monitorização laboratorial frequente podem ser indicados como aspectos negativos do panorama terapêutico atual. O absenteísmo provocado pelo longo tempo de tratamento e pela necessidade de deslocamento têm impacto na qualidade de vida dos pacientes, o que reforça a necessidade de se identificar novas abordagens terapêuticas. (GALVÃO *et al.*, 2019)

Por fim, destaca-se que a leishmaniose cutânea é doença que afeta grande contingente de pessoas e que, apesar da redução da incidência nos últimos anos, sua

relevância epidemiológica se mantém, não só pela estigmatização social e morbidade do tratamento, mas também pelo surgimento de novos focos de doença com o fenômeno atual de migração maciça e invasão de ambientes silvestres em várias partes do mundo. Acrescenta-se, a falta de investimento em novos medicamentos, sendo o reposicionamento dos medicamentos existente uma alternativa importante para o desenvolvimento de novas esquemas terapêuticos.

Assim, apesar as limitações deste estudo, acreditamos ter reunido informações úteis que podem contribuir para a proposição de novas abordagens para o tratamento da leishmaniose cutânea no Brasil. Ainda que esquema ideal com eliminação completa da necessidade de administração parenteral não tenha sido identificado, as combinações aqui avaliadas confirmam a possibilidade de melhora da eficácia com terapias combinadas, deflagrando um novo ciclo de avaliações de variações de esquemas posológicos, na busca da melhor relação entre taxa de cura, facilidade posológica, toxicidade e custo.

## 7. CONCLUSÃO

Os esquemas baseados em anfotericina B lipossomal seguida por miltefosina por via oral ou por antimoniato de meglumina em infiltração intralesional se mostraram mais efetivas e menos tóxicos que os medicamentos usados individualmente, em modelo experimental de hamsters infectados por *L. braziliensis*, sugerindo a viabilidade da estratégia combinada também no tratamento da forma cutânea da leishmaniose.

## 8. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016.

ALVES, L. L. **Eficácia Pré-Clínica do Tratamento Tópico da Leishmaniose Cutânea com Gel Hidrofílico de Paromomicina em Combinação com Leishmanicidas de Uso Sistêmico e Local**. 2018. Instituto René Rachou Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2018.

AMER, E. I.; EISSA, M. M.; MOSSALLAM, S. F. Oral Azithromycin versus Its Combination with Miltefosine for the Treatment of Experimental Old World Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 2, p. 475–484, jun. 2016.

BERBERT, T. R. N. et al. Pentavalent Antimonials Combined with Other Therapeutic Alternatives for the Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review. **Dermatology Research and Practice**, v. 2018, 24 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6323433/>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

BERMÚDEZ, H. et al. Generic Sodium Stibogluconate Is as Safe and Effective as Branded Meglumine Antimoniate, for the Treatment of Tegumentary Leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, n. 7, p. 591–600, out. 2006.

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília, DF: Editora MS, 2017. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)>. Acesso em: 10 maio. 2019.

BRASIL, A. RDC. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 337, DE 11 DE FEVEREIRO DE 2020 - RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 337, DE 11 DE FEVEREIRO DE 2020 - DOU - Imprensa Nacional. . 11 fev. 2020.

BRITO, N. C. et al. Intralesional infiltration versus parenteral use of meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis: A cost-effectiveness analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007856, 5 dez. 2019.

BRITO, N. C.; RABELLO, A.; COTA, G. F. Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, 19 set. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5604971/>>. Acesso em: 19 ago. 2020.

BUKOWSKA, B.; GAJEK, A.; MARCZAK, A. Two Drugs Are Better than One. A Short History of Combined Therapy of Ovarian Cancer. **Współczesna Onkologia**, v. 5, p. 350–353, 2015.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, set. 2018.

CALIXTO, J. B.; JUNIOR, J. M. S. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios The Drug Development in Brazil: Challenges. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, Suplemento 1, p. 98–106, 2008.

CARIDHA, D. et al. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 11, p. 106–117, 20 jun. 2019.

CARVALHO, S. H. et al. American Tegumentary Leishmaniasis in Brazil: A Critical Review of the Current Therapeutic Approach with Systemic Meglumine Antimoniate and Short-Term Possibilities for an Alternative Treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 380–391, 2019.

CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. Mode of Action of Pentavalent Antimonials: Specific Inhibition of Type I DNA Topoisomerase of *Leishmaniadonovani*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 152, n. 2, p. 605–611, 29 abr. 1988.

CHRUSCIK-TALHARI, A. et al. Randomized Controlled Clinical Trial to Assess Efficacy and Safety of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 255–260, 4 fev. 2011.

CONITEC. **Relatorio\_Miltefosina\_LeishmanioseTegumentar.pdf**. Brasil: Ministério da Saúde, out. 2018. Disponível em: <[http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio\\_Miltefosina\\_LeishmanioseTegumentar.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Miltefosina_LeishmanioseTegumentar.pdf)>. Acesso em: 14 jun. 2019.

CROFT, S. L. et al. THE ACTIVITY OF ALKYL P~~SPHORYLCHOLINES AND RELATED DERIVATIVES AGAINST LEISHMANIA DONOVANI. p. 4, 1987.

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine – Discovery of the Antileishmanial Activity of Phospholipid Derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S4–S8, dez. 2006.

CUNHA, M. A. et al. Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 6, p. 1214–1218, 9 dez. 2015.

DE MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. Combined Suboptimal Schedules of Topical Paromomycin, Meglumine Antimoniate and Miltefosine to Treat Experimental Infection Caused by *Leishmania (Viannia) Braziliensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkv254, 7 set. 2015.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochemical Journal**, v. 381, n. Pt 2, p. 405–412, 15 jul. 2004.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 1 nov. 2012.

EMILIANO, Y. S. S.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Efficacy of Apigenin and Miltefosine Combination Therapy against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 8, p. 1910–1913, 24 ago. 2018.

FERNANDES, H. J. **ANÁLISE DA TOXICIDADE RELACIONADA AO USO INTRALESIONAL DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINA PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA**. 2019. Instituto René Rachou Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2019. Disponível em: <[https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/35337/2/D\\_2019\\_Herbert%20Fernandes.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/35337/2/D_2019_Herbert%20Fernandes.pdf)>. Acesso em: 13 nov. 2021.

FERREIRA, W. A. F. versão A. **Complexos anfifílicos de antimônio(V) e composições de fármacos à base antimônio com ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e potencial terapêutico**. 2010. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <[https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SFSA-9QQSLQ/1/tese\\_weverson.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SFSA-9QQSLQ/1/tese_weverson.pdf)>. Acesso em: 26 set. 2020.

FILHO, A. V. da C.; LUCAS, I. C.; SAMPAIO, R. N. R. [Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 424–427, ago. 2008.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167–194, jun. 2006.

FRÉZARD, F. et al. Chemistry of Antimony-Based Drugs in Biological Systems and Studies of Their Mechanism of Action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1–12, 1 maio 2013.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 30 jun. 2009.

GALVÃO, E. L. et al. How cutaneous leishmaniasis and treatment impacts in the patients' lives: A cross-sectional study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0211374, 25 jan. 2019.

GAMBOA, D. et al. Evaluation of an *in Vitro* and *in Vivo* Model for Experimental Infection with *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and *L. (V.) Peruviana*. **Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 319–326, mar. 2008.

GOMES-SILVA, A. et al. Golden Hamster (*Mesocricetus Auratus*) as an Experimental Model for *Leishmania (Viannia) Braziliensis* Infection. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 771–779, maio 2013.

GOODMAN, L. S. et al. (ed.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11th ed ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 1 jan. 2010.

HAMILL, R. J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919–934, jun. 2013.

HARMS, G. et al. Treatment of Imported New World Cutaneous Leishmaniasis in Germany: Treatment of Imported Cutaneous Leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 11, p. 1336–1342, nov. 2011.

HOMMEL, M. et al. Experimental Models for Leishmaniasis and for Testing Anti-Leishmanial Vaccines. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 89, n. sup1, p. 55–73, dez. 1995.

KARJALAINEN, E.; REPASKY, G. A. Molecular Changes During Acute Myeloid Leukemia (AML) Evolution and Identification of Novel Treatment Strategies Through Molecular Stratification. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier, 2016. 144p. 383–436.

KIMMELMAN, J.; MOGIL, J. S.; DIRNAGL, U. Distinguishing between Exploratory and Confirmatory Preclinical Research Will Improve Translation. **PLoS Biology**, v. 12, n. 5, p. e1001863, 20 maio 2014.

KIP, A. E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, n. 2, p. 151–176, 2018.

KUHLENCORD, A. et al. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 8, p. 1630–1634, ago. 1992.

LANDIS, S. C. et al. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 187–191, 11 out. 2012.

LIMA, E. B. de et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111–124, abr. 2007.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. e912, 21 dez. 2010.

MACHADO, P. R. L. et al. Treatment of Disseminated Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 945–949, 15 set. 2015.

MONGE-MAILLO, B.; LOPEZ-VELEZ, R. Miltefosine for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: Drug Characteristics and Evidence-Based Treatment Recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, p. civ004, 18 jan. 2015.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; DE PAULA-COELHO, V. N. Meglumine Antimonate Directly Increases Phagocytosis, Superoxide Anion and TNF- $\alpha$  Production, but Only via TNF- $\alpha$  It Indirectly Increases Nitric Oxide Production by Phagocytes of Healthy Individuals, in Vitro. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 12, p. 1633–1638, 10 dez. 2008.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, dez. 2011.

OBONAGA, R. et al. Treatment Failure and Miltefosine Susceptibility in Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania* Subgenus *Viannia* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 144–152, jan. 2014.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, maio 2011.

OPAS, O. P. A. de S. **Leishmanioses - Informe Epidemiológico das Américas**. Washington: Organização Pan-Americana de Saúde, mar. 2019. . Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>. Acesso em: 10 maio. 2019.

OPAS, O. P. A. de S. **Leishmanioses - Informe epidemiológico das Américas**. Washington, D.C: Organização Pan-Americana de Saúde, dez. 2020. . Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>>. Acesso em: 29 ago. 2021.

PAULA, C. C. D. **INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE Leishmania EM LESÕES CUTÂNEAS CICATRIZADAS E PELE SADIA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CLINICAMENTE CURADOS**. 2010. FUNDAÇÃO OSWALD CRUZ, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/7416/1/cintia\\_paula\\_ipecc\\_mest\\_2013.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/7416/1/cintia_paula_ipecc_mest_2013.pdf)>. Acesso em: 15 nov. 2021.

PEDRIQUE, B. et al. The Drug and Vaccine Landscape for Neglected Diseases (2000–11): A Systematic Assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. e371–e379, 1 dez. 2013.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug Resistance and Treatment Failure in Leishmaniasis: A 21st Century Challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017.

RAMALHO, D. B. **Estudo clínico para avaliação da eficácia e segurança do uso intralesional de antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea localizada**. 2017. Instituto René Rachou Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2017.

RIJAL, S. et al. Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-Azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 11, p. 1530–1538, jun. 2013.

SALDANHA, A. C. R. et al. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88R e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea: I. Eficácia e segurança. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 383–387, ago. 1999.

SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P. et al. Low Plasma Membrane Expression of the Miltefosine Transport Complex Renders *Leishmania braziliensis* Refractory to the Drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1305–1313, abr. 2009.

SANTAREM, A. A. A. et al. Effectiveness of Miltefosine-Pentoxifylline Compared to Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in C57Bl/6 Mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 517–520, ago. 2014.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 18 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486117/>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

SHIRZADI, M. R. Liposomal Amphotericin B: A Review of Its Properties, Function, and Use for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 10, p. 11–18, abr. 2019.

SOTO, J. et al. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. e57–e61, out. 2001.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, 1 maio 2004.

SOUZA, C. S. A. de. **Análise Temporal, Espacial e Fatores Associados à Mortalidade por Leishmaniose Tegumentar no Brasil**. 2018. Instituto René Rachou Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2018.

STONE, N. R. et al. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. **Drugs**, v. 76, n. 4, p. 485–500, mar. 2016.

SUNDAR, S. et al. Comparison of Short-Course Multidrug Treatment with Standard Therapy for Visceral Leishmaniasis in India: An Open-Label, Non-Inferiority, Randomised Controlled Trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9764, p. 477–486, fev. 2011.

SUNDAR, S. et al. Efficacy of Miltefosine in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India After a Decade of Use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543–550, 15 ago. 2012.

SUNYOTO, T.; POTET, J.; BOELAERT, M. Why miltefosine—a life-saving drug for leishmaniasis—is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 3, 3 maio 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5935166/>>. Acesso em: 23 ago. 2020.

TITUS, R. G. et al. A Limiting Dilution Assay for Quantifying *Leishmania Major* in Tissues of Infected Mice. **Parasite Immunology**, v. 7, n. 5, p. 545–555, set. 1985.

TUON, F. F. et al. Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis – a Systematic Review with a Meta-Analysis. **International Journal of Dermatology**, p. 16, 2008.

VAKIL, N. H.; FUJINAMI, N.; SHAH, P. J. Pharmacotherapy for Leishmaniasis in the United States: Focus on Miltefosine. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 35, n. 5, p. 536–545, 2015.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination Therapy for Visceral Leishmaniasis. v. 10, p. 11, 2010.

VÉLEZ, I. et al. Efficacy of Miltefosine for the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 351–356, 5 ago. 2010.

WASUNNA, M. et al. Efficacy and Safety of AmBisome in Combination with Sodium Stibogluconate or Miltefosine and Miltefosine Monotherapy for African Visceral Leishmaniasis: Phase II Randomized Trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, 14 set. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5023160/>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

WHO, W. H. O. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22 - 26 March 2010**In: MEETING. EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASIS. Geneva: World Health Organization, 2010. .

WORTMANN, G. et al. Liposomal Amphotericin B for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1028–1033, 5 nov. 2010.

## 9. APÊNDICES

## APÊNDICE A

<i>Momento de avaliação</i>	<i>Miltefosina 25mg/kg</i>	<i>Miltefosina 50mg/kg</i>	<i>Controle</i>
<b>D1</b>	11,70	12,30	15,40
	20,10	22,40	16,60
	10,10	13,10	11,20
	17,50	19,60	18,80
	18,20	14,40	19,80
<b>D7</b>	19,80	15,50	19,40
	21,70	23,90	19,60
	16,80	14,50	11,80
	23,40	23,10	19,20
	15,90	18,70	24,10
<b>D14</b>	21,20	20,00	21,30
	25,00	25,00	22,30
	25,00	23,60	19,80
	25,50	25,90	21,00
	22,50	18,90	26,50
<b>D23</b>	22,70	20,30	18,90
	22,00	22,20	23,80
	29,50	22,40	27,10
	25,70	*	27,80
	26,50	19,20	29,00

**LEGENDA:** Evolução do tamanho do maior diâmetro da lesão dos grupos tratados com miltefosina e controle

dados individuais, média  $\pm$  desvio padrão

\*Animal morto ao longo do tratamento, possivelmente por problemas na gavagem

## APÊNDICE B

Esquemas terapêuticos	Medida do Maior Diâmetro da lesão								
	D1		D7		D14		D23		
Anfotericina B lipossomal 10mg/kg, via intraperitoneal; dose única		19,50		20,20		15,00		11,30	
		16,40		16,40		17,70		20,30	
		14,30	19,5	17,20	20,40	10,20	17,70	11,90	
		22,00	(16,40 - 22,00)	20,40	(17,20 - 23,00)	17,60	(15,00 - 19,30)	17,70	(11,90 - 20,30)
		22,80		22,80		17,90		14,90	
		19,80		23,00		23,90		25,00	
		19,00		23,00		19,30		18,40	
Antimoniato de meglumina via intralésional, infiltração única		19,80		18,20		16,90		17,10	
		15,60		19,40		19,90		17,90	
		16,10	19,60	18,20	18,20	10,30	17,40	13,30	
		19,60	(16,10 - 21,30)	21,20	(16,90 - 21,20)	17,90	(10,38 - 18,40)	17,60	17,35
		17,90		26,70		-		-	(13,53 - 17,98)
		21,30		16,90		17,90		18,20	
		22,10		14,70		10,40		13,60	
Anf Lip IP dose única, 10mg/kg + AM IL, infiltração única		18,90		20,60		9,00		0,00	
		16,50		17,80		12,90		10,70	
		18,70	18,90	21,20	20,90	14,20	13,55	15,50	
		21,00	(16,50 - 21,80)	21,90	(15,85 - 21,90)	15,00	(9,53 - 16,28)	12,30	11,50
		21,80		-		-		-	(6,30 - 17,03)
		22,10		21,90		20,10		21,60	
		12,30		10,00		9,70		8,40	
Miltefosina 25mg, via gavagem – 1 x dia x 20 dias		22,20		23,60		-		-	
		19,90		24,20		27,80		-	
		20,90	20,30	20,30	21,00	20,00	20,25	17,10	21,10
		11,80	(17,50 - 21,30)	18,00	(18,00 - 24,20)	18,70	(19,45 - 23,00)	21,10	(18,80 - 21,55)
		17,50		18,00		19,70		21,30	
		21,30		25,80		21,40		21,80	
		20,30		21,00		20,50		20,50	
Anf Lip IP dose única, 10mg/kg + Miltefosina 25mg, via gavagem – 1 x dia x 20 dias		19,60		22,00		17,90		15,40	
		19,90		17,80		11,90		10,80	
		17,20	19,60	18,90	20,90	17,00	14,85	18,80	13,10
		16,50	(17,20 - 22,60)	17,50	(17,80 - 21,90)	10,00	(11,43 - 17,23)	6,70	(8,35 - 16,93)
		17,70		21,90		-		-	
		22,60		21,20		16,90		16,30	
		25,30		20,90		12,80		8,90	
AM IL, infiltração única + Miltefosina 25mg, via gavagem – 1 x dia x 20 dias		21,80		22,80		21,20		20,70	
		18,30		19,80		19,10		19,50	
		18,80	18,80	17,90	19,80	-	19,10	-	20,10
		21,60	(17,60 - 21,60)	21,20	(18,10 - 21,20)	15,90	(16,95 - 20,65)	15,60	(16,58 - 21,45)
		20,00		20,60		20,10		21,70	
		17,60		18,90		-		-	
		14,40		18,10		18,00		-	
Controle - sem tratamento		18,50		22,40		20,70		19,70	
		16,20		18,70		17,90		16,20	
		18,50	18,50	21,10	20,90	16,60	21,00	18,60	19,70
		17,40	(17,40 - 19,50)	16,70	(18,20 - 22,40)	21,60	(17,90 - 22,20)	20,40	(18,40 - 22,20)
		18,70		20,90		22,20		23,20	
		19,50		22,60		25,20		22,20	
		21,60		18,20		21,00		18,40	

**LEGENDA:** Evolução do tamanho do maior diâmetro da lesão de acordo com a intervenção dados individuais, mediana (percentil 25 - percentil 75)

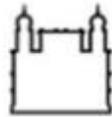
### APÊNDICE C

Esquemas terapêuticos	Massa corporal (g)			
	D1		D23	
Controle - sem tratamento	120,90	135,2 ± 12,7	107,10	115,1 ± 8,1
	130,10		109,80	
	129,70		119,80	
	128,70		120,80	
	134,50		104,40	
	142,20		117,80	
	160,00		126,10	
Anfotericina B lipossomal 10mg/kg, via intraperitoneal; dose única	125,50	127,8 ± 9,2	123,60	116,2 ± 10,7
	145,80		125,30	
	122,90		117,90	
	134,30		105,60	
	119,90		120,10	
	122,00		97,30	
	124,10		123,60	
Antimoniato de meglumina via intralesional, infiltração única	119,00	122,5 ± 5,9	116,50	118,6 ± 8,9
	120,80		117,10	
	125,50		130,40	
	125,80		114,00	
	113,90		-	
	132,30		106,10	
	120,20		127,50	
Anf Lip IP dose única, 10mg/kg + AM IL, infiltração única	118,20	124,5 ± 15,1	113,00	118,0 ± 10,9
	130,90		123,90	
	130,00		109,40	
	111,20		114,80	
	102,30		-	
	148,10		109,50	
	130,50		137,50	
Miltefosina 25mg, via gavagem – 1 x dia x 20 dias	124,10	124,2 ± 5,4	-	96,18 ± 4,7
	130,70		-	
	118,40		95,70	
	118,00		89,70	
	130,30		94,60	
	127,30		98,70	
	120,90		102,20	
Anf Lip IP dose única, 10mg/kg + Miltefosina 25mg, via gavagem – 1 x dia x 20 dias	121,50	121,2 ± 13,8	101,40	114,1 ± 11,1
	100,40		104,00	
	122,90		110,80	
	127,80		118,50	
	105,10		-	
	137,40		131,70	
	133,10		118,30	
AM IL, infiltração única + Miltefosina 25mg, via gavagem – 1 x dia x 20 dias	121,50	135,2 ± 15,8	88,80	100,1 ± 11,9
	122,90		99,90	
	157,00		-	
	132,40		116,70	
	125,50		94,80	
	158,40		-	
	128,90		-	

**LEGENDA:** Evolução do peso dos animais de acordo com a intervenção dados individuais, média ± desvio padrão

## 10. ANEXO

## Anexo A



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo CruzVice-Presidência de Pesquisa e Coleções  
Biológicas - VPPCBComissão de Ética  
no Uso de Animais

## LICENÇA

LW-4/20

Certificamos que o protocolo (P-37/19.5), intitulado "ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL E CUTÂNEA", sob a responsabilidade de **GLAUCIA FERNANDES COTA** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

**Esta licença tem validade até 06/04/2024 e inclui o uso total de:**

***Mesocricetus auratus***

- 907 machos de Golden, peso: 80 gramas;

***Mus musculus***

- 844 fêmeas de BALB/c, peso: 20 gramas.

Rio de Janeiro, 06 de abril de 2020.

**Octavio Augusto França Presgrave**  
Coordenador da CEUA/Fiocruz

**LEGENDA:** Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais