UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (CIPHARMA)

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

KELLY CRISTINA KATO

OURO PRETO – MG – BRASIL
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (CIPHARMA)

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

KELLY CRISTINA KATO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof[a.] Dr[a] Neila Márcia Silva Barcellos
Co-orientador: Prof. Dr. Frederic Jean Georges Frezard
Co-orientadora: Prof[a] Dr[a] Andrea Grabe Guimarães

Ouro Preto
Escola de Farmácia - UFOP
2008

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original."
(Albert Einstein **)**

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus todo poderoso e Maria nossa mãe
que me inspiraram o início e me guiaram até o final deste trabalho.

À minha querida filha:
Ana Eduarda Kato Teixeira pela compreensão, paciência,
carinho, alegrias e privações em todos os momentos desta jornada.

Às minhas estimadas irmãs:
Ana Paula e Regina Estella
pelo apoio ,paciência e esperança que depositaram em mim
durante toda essa caminhada.

Aos meus pais
Olga Sisue Mamose Kato (in memorian) e
Paulo Mitihiro Kato, pelo seu exemplo de força e por todo amor e carinho.

Ao meu marido:
Fernando
pelo incentivo, companheirismo, dedicação e amor.

Agradecimentos

À professora Dr[a]. Neila Barcellos, meu sincero agradecimento, pela sua dedicação, seu estímulo, pela sua inesgotável paciência e suas cobranças e orientação, que tanto contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho.

Às professoras Dr[a]. Andrea Grabe e Dr[a]. Cláudia Carneiro, na tarefa de injeção de ânimo, pela infinita disposição para ajudar, seus constantes auxílios com dicas e orientações, suas presenças nos momentos de dificuldade e sobretudo, por acreditar em mim.

Ao colaborador: Dr.Fréderic Frézard pela inesgotável disposição em ajudar, pelas orientações na concretização deste trabalho e pelo fornecimento dos fármacos que subsidiaram este trabalho.

À professora Dr[a] Maria Ruth Carrilo pelo auxílio e orientações na resolução de dificuldades.

Ao professor Roney Nicolato e Cássio pela colaboração nas análises bioquímicas e inesgotável auxílio.

Ao professor Ricardo Tavares, pela orientação nos testes estatísticos.

Ao professor Wanderson Lima pela paciência e prontidão constante em ajudar.

À equipe do laboratório de Farmacologia Experimental pelo auxílio na realização deste trabalho e pelo carinho e companheirismo.

À equipe do Laboratório de Imunopatologia pela paciência e companheirismo, em especial.à Maria pela paciência em ensinar a arte na confecção de lâminas.

À equipe do Lapac, em especial ao Adão e Nonote pela paciência, amizade e colaboração na realização das análises bioquímicas.

Ao Wilson pela dedicação, amizade e ajuda no manejo dos animais.

À equipe do Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, UFMG pelas dosagens de Sb nos fármacos e nas amostras.

À Lorena, pela companhia, conversas e amizade.

Aos amigos Gleicy, Herlaine, Markim, JP, Nandinha pelo apoio.

Aos companheiros de mestrado pelas conversas e períodos de descontração e desabafo.

Resumo

No Brasil, o antimoniato de meglumina, medicamento à base de antimônio, é o fármaco de primeira escolha na terapêutica da leishmaniose. O alto custo do tratamento é um desafio que deve ser ultrapassado e que justifica a busca por alternativas terapêuticas. Assim, a disponibilidade de produtos sintéticos pode facilitar economicamente estudos de fármacos antimoniais pentavalentes e propiciar o desenvolvimento de novos medicamentos; por isto dois simples e eficientes métodos de obtenção de antimoniato de meglumina, utilizando como fonte de antimônio V $SbCl_5$ (produto AM) ou $KSb(OH)_6$ (produto AM1), foram desenvolvidos por Demicheli e cols. (1999-PI 9907575-0 e 2001-PI 0106305-7), e vêm sendo aplicados em diferentes estudos, uma vez que a análise dos mesmos mostrou similaridade com o fármaco comercial (Glucantime®) (Demicheli *et al.,* 2003). No entanto, mesmo sendo os antimoniais fármacos empregados a muito tempo no tratamento da *leishmaniose* mostrando elevada efetividade, induzem efeitos adversos após sua aplicação, tais como: anormalidades no eletrocardiograma e nos níveis de transaminases, pancreatite e nefrotoxicidade. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade pancreática, hepática, renal e cardíaca, do antimoniato de meglumina obtido por diferentes rotas sintéticas: $SbCl_5$ (AM) e $KSb(OH)_6$ (AM1) e comercial (GLUC), no modelo ratos Wistar através de dosagens bioquímicas de amilase, AST, ALT, fosfatase alcalina, dosagens urinárias de sódio, potássio e proteínas, depuração de creatinina e CKMB; análise de ECG e PA; além de análise histológica dos órgãos em dois protocolos de administração dos fármacos: A: sub-agudo no qual os animais receberam 50 mg SbV/kg/dia VIP por até 30 dias,e foram realizadas análises nos dias 3, 7, 15 e 30 dias; e B: protocolo agudo no qual dose única de 500 mg de SbV/kg, foi administrada VIV.

Inicialmente, para caracterização dos fármacos foram realizados doseamentos de SbIII e potássio residuais. Os resultados mostraram que os teores de Sb III nos fármacos AM, AM1 e GLUC, foram de 0,2%; 0,011% e 0,12% e de potássio 39,0; 113,0 e 10,2 mmol/L, respectivamente.A avaliação da toxicidade pancreática mostrou que AM, AM1 e GLUC, induziram alterações crescentes no teor de amilase, porém microscopicamente, apenas no tratamento agudo, pequena congestão celular pode ser identificada; estes resultados indicaram apenas indução de leve toxicidade pancreática nas condições experimentais empregadas. A avaliação hepática mostrou elevação sérica de AST induzida pelo tratamento com GLUC por 30 dias (423,2 U/L) em relação ao grupo controle (155,7 U/L) bem como de fosfatase alcalina induzida pelo tratamento por 15 e 30 dias com AM (231,8 e 260,0 U/L, respectivamente) em relação ao grupo controle (163,3 e 183,2 U/L), possíveis indicativos de toxicidade sub-aguda induzida pelos fármacos. No entanto, a análise histológica, não revelou alterações significativas,

exceto por leve congestão hepática na administração aguda. Quanto à avaliação renal foi observada leve alteração de parâmetros bioquímicos: aumento significativo na variação de potássio (AM-15 (60,9%); AM1- 3 (45,0%) e 15 (44,2%) e GLUC-3 (40,4%) e 7 dias (53,6%) e sódio (AM- 15 dias (163,8%) em relação ao grupo controle que mostrou para variação de potássio em 3, 7 e 15 dias (-12,6%, -15,7% e -9,6% respectivamente) e para sódio (-0,6%). Já análise histológica apresentou também leve congestão tecidual apenas no tratamento agudo. Estes resultados foram considerados indicativos da não ocorrência de lesões renais). A avaliação cardiovascular não revelou diferenças significativas nas dosagens bioquímicas de CKMB em ambos os protocolos estudados e a análise histológica apresentou apenas leve congestão após administração em dose única no protocolo agudo, assim como nos outros órgãos. Já os sinais de ECG, obtidos após administração por até 30 dias dos fármacos estudados, protocolo sub-agudo, não mostraram diferenças significativas para o intervalo PR e para o complexo QRS houve diferença significativa apenas para AM1 após 15 dias (AM1 28,8% e AM_{cont} 23,1%). Já o intervalo QT apresentou aumento significativo nos tempos de 15 (AM 89,3% e AM_{cont} 71,8%). e 30 (AM 88,4% e AM_{cont} 72,2%). dias para o AM e nos tempos 7 (AM1 103,2% e $AM1_{cont}$ 84,0%). e 15 (AM1 115,1% e $AM1_{cont}$ 92,2%). dias para o AM1; não tendo sido observada diferença significativa para o GLUC, embora sua administração tenha induzido a aumentos da ordem de 10% neste parâmetro. Quanto à avaliação de QTc, foram observados aumentos significativos: induzidos por AM em todos os tempos avaliados sendo observado os seguintes valores para o período controle e após administração: 131,0% e 161,8% para o tempo de 3 dias; 137,5% e 158,8% para 7 dias; 138,4% e 166,2% para 15 dias e 135,6% e 135,6 % para 30 dias**..** e após 7 dias de administração do AM1 (AM1 181,7% e $AM1_{cont}$ 157,4%). Por outro lado, a avaliação destes parâmetros cardiovasculares após administração de dose única de 500 mg/Kg, no protocolo agudo, não induziu variações significativas em nenhum parâmetro de ECG analisado. Os dados obtidos de pressão arterial (PA) e freqüência cardíaca (FC) no protocolo sub-agudo mostraram, respectivamente, significativa queda da PA induzida por AM1 no tempo 15 dias (PAS 63,0 e PAD 47,4 mmHg) em relação ao grupo controle (PAS 103,8 e PAD 67,2 mmHg),. e significativa bradicardia induzida por AM no tempo de 15 dias (AM 392 bpm e AM_{cont} 432 bpm). Estes resultados mostram que os fármacos AM, AM1 e GLUC não induziram danos cardíacos significativos, indicando relativa segurança na utilização destes nas condições estudadas.Os dados obtidos neste estudo mostraram correlação de toxicidade hepática, renal e cardíaca com o fármaco AM que apresentou maior teor residual de SbIII (0,2%) e correlação de toxicidade renal e cardíaca com o fármaco AM1 que apresentou maior teor residual de potássio (113 mmol/L). No entanto, a análise conjunta dos dados das análises bioquímica, histológica e

de alterações de ECG e PA, revelaram uma similaridade e relativa segurança na administração de AM, AM1 e GLUC tanto no protocolo sub-agudo onde foi utilizada a dose de 50 mg SbV/kg/dia por até 30 dias, quanto no protocolo agudo, onde uma dose dez vezes maior (500 mg SbV/kg) foi avaliada, uma vez que não houveram dados que evidenciassem lesões pancreáticas, hepáticas, renais ou cardiovasculares nessas condições experimentais.

Abstract

In Brazil, the meglumine antimoniate, drug produced by the reaction of pentavalent antimony with *N*-methyl-D-glucamine, is the drug of choice for the treatment of leishmaniasis. The high cost of treatment is a challenge necessary to be overcome and justify the research of others therapeutics. Moreover, the available of synthetic products should facilite economically the academic studies of pentavalent antimonial drugs and also render favorable conditions to accelerate the development of new drugs. This way two simple and efficient procedures for the preparation of meglumine antimoniate using as source of antimony (V) the antimony pentachloride ($SbCl_5$) (product AM) or potassium hexahydroxoantimonate ($KSb(OH)_6$) (product AM1) were designed by Demicheli e cols (1999-PI 9907575-0 e 2001-PI 0106305-7) and have been used in diferent studies due to the similarity with commercial drug (Glucantime®) (Demicheli *et al.,* 2003). Nevertheless, in spite of pentavalent antimony compounds have been used for half a century in leishmaniasis treatment and proven to be effective drugs, these compounds induce adverse effects as electrocardiographic and transaminases abnormalities, pancreatic and nefrotoxicity. In this context, this work aimed to evaluate the pancreatic hepatic, renal, and cardiac toxicity of meglumine antimoniate obtained by diferent synthetics routes: $SbCl_5$ (AM) and $KSb(OH)_6$ (AM1) and comercial drug (GLUC) in a Wistar rat model through of biochemistry dosage of amylase, (AST), (ALT), alkaline phosphatase, urinary dosage of sodium and potassium, creatinine clearance and CKMB, analyse of electrocardiogram (ECG) and PA, beyond histological analysis of the tissues through two protocols. In the-sub-acute protocol the animals were treated with a dose of 50 mg of SbV/kg/day for 3, 7, 15 or 30 days VIP and in acute protocol, the drugs were administered as single dose of 500 mg of SbV/kg VIV. Initially, for characterization of the drugs, the residual SbIII and potassium dosage were performed. The outcomes showed that fraction of SbIII present in AM, AM1 and GLUC, drugs was 0,2%; 0,011% e 0,12% and of potassium was 39,0; 113,0 e 10,2 mmol/L respectively. The pancreatic evaluation showed that AM, AM1 and GLUC induced alterations of amylase, however microscopically, only in the acute protocol, small cellular congestion could be identified. These results indicated, in the experimental conditions used, low pancreatic toxicity.The hepatic evaluation showed increase of serum levels of AST induced by GLUC for 30 days (423,2 U/L) in respect to control group (155,7 U/L), as well as fosfatase alkaline induced by treatment for 15 and 30 days with AM (231,8 e 260,0 U/L, respectively), suggesting sub-acute toxicity of the drugs. However, the histologic analysis was not able to disclose significant alterations, except low hepatic congestion in the acute administration. In respect of the renal evaluation, it was observed a little alteration of biochemistry parameters such as

significant increase of potassium variation (AM-15 (60,9%); AM1- 3 (45,0%) and 15 (44,2%) and GLUC - 3 (40,4%) and 7 days (53,6%) and sodium (AM- 15 days(163,8%)) in respect to control group that showed for potassium variation for 3, 7 and 15 day (-12,6%, -15,7% e -9,6% respectively) and for sodium (-0,6%). Besides, the histologic analysis demonstrated a little tecidual congestion only in the acute protocol. These results are indicative of absence of renal injuries. The cardiovascular evaluation did not report significant differences in biochemistry dosage of CKMB in both studied protocols and the histologic analysis demonstrated only a low tecidual congestion after the administration of the single dose in the acute protocol, as well as in others organs. The analysis of ECG signals after administration for 30 days of drugs in sub-acute protocol, did not show significant differences for PR interval and QRS complex. There was significant difference only for AM1 after 15 days (AM1 28,8% e AM_{cont} 23,1%). for QRS complex. The QT interval revealed significant increase after 15 (AM 89,3% e AM_{cont} 71,8%) and 30 days (AM 88,4% e AM_{cont} 72,2%) for AM and after 7 (AM1 103,2% e $AM1_{cont}$ 84,0%) and 15 days (AM1 115,1% e $AM1_{cont}$ 92,2%) for AM1, and for GLUC no differences occcured, although 10% of increase was observed. For QTc, AM induced significant increases in all times evaluated and showed for control time and after administration time AM1 only after 7 days of administration 131,0% and 161,8% for 3 days, 137,5% and 158,8% for 7 days; 138,4% and 166,2% for 15 days and 135,6% and 135,6 % for 30 days and after 7 days of AM1 administration (AM1 181,7% and $AM1_{cont}$ 157,4%). On the other hand, the evaluation of these cardiovascular parameters, after administration of single dose 500 mg/Kg in acute protocol, did not induce significant variation of ECG parameters analyzed. The datas obtained of arterial pressure (PA) and cardiac frequency (FC) in sub-acute procotol revealed, respectively, significant decrease of PA induced by AM1 at time 15 days (PAS 63,0 e PAD 47,4 mmHg) in respect to control group (PAS 103,8 and PAD 67,2 mmHg), and significant bradicardia induced by AM at time 15 days (AM 392 bpm and AM_{cont} 432 bpm). The results obtained in this study showed correlacion of hepatic, renal and cardiac toxicity with AM drug that showed higher residual SbIII (0,2%) and correlacion of renal and cardiac toxicity with AM1 drug that showed higher residual potassium (113 mmol/L). However, the whole evaluation of biochemistry and histologic analysis and analyse of ECG and PA revealed a similarity and relative safety in administration of AM, AM1 and GLUC such in sub-acute protocol, when was administered the dose 50 mg SbV/kg/day for 30 days, as much as in acute protocol when a dose ten folds higher (500 mg SbV/kg) was evaluated, since there is no data that evidenciate pancreatic hepatic, renal, and cardiac damage in the experimental

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Formação e estrutura química proposta do antimoniato de meglumina 4
Figura 2: Fórmula estrutural proposta para estibogluconato de sódio..... 4
Figura 3: Mecanismo de ação e resistência dos antimoniais pentavalentes 10
Figura 4: Registro de eletrocardiograma e potencial de ação de uma célula miocárdica ventricular 20
Figura 5: Sistema de aquisição de sinais de eletrocardiograma e pressão arterial 27
Figura 6: Protocolo das atividades desenvolvidas no protocolo sub-agudo 28
Figura 7: Protocolo de atividades desenvolvidas no protocolo agudo 29
Figura 8: Protocolo de atividades desenvolvidas na etapa de análise histológica..... 30
Figura 9: Valores séricos de amilase após administração sub-aguda..... 34
Figura 10: Valores séricos de amilase após administração aguda..... 35
Figura 11: Valores séricos de AST; ALT e fosfatase alcalina após administração sub-aguda .. 38
Figura 12:Valores de variação de potássio e sódio excretado na urina em 24 horas após administração sub-aguda 44
Figura 13: Variações de Intervalos de ECG: intervalo PR, intervalo QRS, intervalo QT e intervalo QTc após administração sub-aguda 53
Figura 14: variação de Intervalo FC, médias dos valores absolutos de PAS (pressão arterial sistólica) de PAD (pressão arterial diastólica) após administraçãosub-aguda 54
Figura 15: Variação de Intervalo PR durante 60 minutos após administração aguda 58
Figura 16: Variação de Intervalo QRS durante 60 minutos após administração aguda 59
Figura 17: Variação de Intervalo QT durante 60 minutos após administração aguda 59
Figura 18: Variação de Intervalo QTc durante 60 minutos após administração aguda..... 60
Figura 19: Variação de FC durante 60 minutos após administração aguda 60
Figura 20: Cortes transversais de corações dos animais tratados com salina tamponada 61
Figura 21:Cortes transversais de corações dos animais tratados com AM..... 61
Figura 22: Cortes transversais de corações dos animais tratados com AM1 62
Figura 23: Cortes transversais de corações dos animais tratados com GLUC..... 62
Figura 24: Prancha ilustrando coração de ratos após administração aguda 63
Figura 25: Concentração de Sb no soro de ratos após 24 horas da administraçãosub-aguda..... 64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas químicas de antimoniais trivalentes empregados na clínica médica, com os respectivos nomes químicos e comerciais. 11
Tabela 2: Teor de SbIII residual nos compostos antimoniais..... 32
Tabela 3: Concentração de potássio residual das soluções de compostos antimoniais..... 33
Tabela 4: Valores séricos de AST, ALT e fosfatase alcalina após administração aguda..... 40
Tabela 5:Valores de clearance de creatinina (não ajustado) após administração sub-aguda 42
Tabela 6: Valores de proteinúria após administração sub-aguda 42
Tabela 7: Valores séricos de CKMB após administração sub-aguda 48
Tabela 8: Valores séricos de CKMB após administração aguda..... 55
Tabela 9: Média dos valores absolutos de freqüência cardíaca e parâmetros eletrocardiográficos avaliados após administração aguda..... 57
Tabela 10: Valores séricos de amilase após administração aguda 75
Tabela 11: Valores séricos de amilase nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos..... 75
Tabela 12: Valores séricos de AST após administração sub-aguda 76
Tabela 13: Valores séricos de ALT após administração sub-aguda 76
Tabela 14: Valores séricos de fosfatase alcalina após administração sub-aguda 76
Tabela 15: Valores de variação de potássio (%) excretado na urina em 24 horas após administração sub-aguda 77
Tabela 16: Valores de variação de sódio (%) excretado na urina em 24 horas após administração sub-aguda 77
Tabela 17: Média dos valores absolutos de freqüência cardíaca e parâmetros eletrocardiográficos avaliados após a administração sub-aguda. 78
Tabela 18:Concentração de Sb no soro após 24 horas da administração sub-aguda..... 80

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADH-hormônio anti-diurético

ALP-fosfatase alcalina

ALT-aspartato alaninatransferase

AM-antimoniato de meglumina cuja fonte de SbV seja $SbCl_5$

AM1-antimoniato de meglumina cuja fonte de SbV seja $KSb(OH)_6$

AST-aspartato aminotransferase

AsIII.-arsênio trivalente

ATP-adenosina trifosfato

AV-àtrio ventricular

bpm-batidas por minuto

BPR-bromopirogalol

$C_{máx}$-concentração máxima

Ca^{2+}-cálcio

CDC-Centers for Disease Control (Centros de Controle de Doenças)

CKMB-creatino quinase fração MB

CNP- 2-cloro-4-nitrofenol

CNP-2 - 2- cloro-4- nitrofenil-maltosídeo

Cols-colaboradores

CP-G3- 2-cloro-4-nitrofenilmaltriosídeo

CPMP-Comitê para Produtos de Propriedade Medicinal

Cys-cisteína

Cys-Gly-cisteína- glicina

DEA-dietanolamina

dL-decilitro

DNA-àcido desoxiribonucleotídeo

DU-dose única

ECG-eletrocardiograma

EPM-erro padrão da média

FC-frequência cardíaca

FG-filtração glomerular

G-glicose

G3-maltotrose

GLUC-Glucantime®

GSH-glutationa

GTP ou AGP –guanosina

HE-hematoxilina-eosina

hERG-tipo de canal de K^+ (human ether a-go-go related gene)

HIV-vírus da imunodeficiência humana

ICB-Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

IC_{50}- concentração inibitória para 50%

K^+-potássio

KDa-kilodaltons

kg-kilograma

$KSb(OH)_6$-hexahidroxiantimoniato de potássio

l.- leishmaniose

L-litro

LAPAC-Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da UFOP

LC-leishmaniose cutânea

LCA-leishmaniose cutânea americana

LM-leishmaniose mucocutânea

LQTS - Síndrome adquirida de prolongamento QT

LV-leishmaniose visceral

MDH-malato desidrogenase
MRP- multi-resistência a fármacos
mg-miligrama
min-minuto
ml-mililitro
mmHg-milímetro de mercúrio
mmol-milimol
mV-milivolt
Na^+-sódio
NADH-nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nm-nanômetro
OMS-Organização Mundial de Saúde
PA-pressão arterial
PAD-pressão arterial diastólica
PAS-pressão arterial sistólica
p-NFF- p-nitrofenilfosfosfato
QTc-intervalo QT corrigido pelo intervalo RR
SbIII- antimônio trivalente
$SbCl_5$ - pentacloreto de antimônio
SbV-antimônio pentavalente
$t_{½}$ -meia vida
TDR1-enzima redutase dependente de tiol
$T(SH)_2$-tripanotiona (tiol específico do parasito leishmania)
UFMG-Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP-Universidade Federal de Ouro Preto
U/L-unidades/litro
VIM- via intramuscular
VIP-via intraperitoneal
VIV-via endovenosa
µg-microgramas

Sumário

Resumo..... i
Abstract..... iv
Índice de Figuras..... vi
Índice de Tabelas..... vii
Índice de abreviaturas, siglas e símbolos..... viii

I.Introdução..... 1
II.Revisão da Literatura..... 3
2.1. Química do Antimoniato de Meglumina..... 3
2.2. Novas Formas de obtenção de Antimoniato de Meglumina..... 5
2.3. Farmacocinética dos compostos antimoniais pentavalentes..... 5
2.4. Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes 6
2.5. Resistência ao tratamento com o uso de antimoniais 8
2.6. Uso terapêutico na Leishmaniose..... 10
2.7. Toxicidade dos agentes antimoniais..... 13
2.7.1. Alterações hepáticas..... 14
2.7.2. Alterações pancreáticas..... 15
2.7.3. Alterações renais..... 16
2.7.4. Alterações cardiovasculares..... 17
2.8. O Potencial de Ação e o Eletrocardiograma..... 19
2.9. Fármacos cardiotóxicos..... 20
III. Objetivos..... 22
3.1. Objetivo geral..... 22
3.2. Objetivos específicos..... 22
IV. Materiais e Métodos..... 23
4.1. Fármacos..... 23
4.2. Análises bioquímicas..... 23
4.3. Doseamento de Sb III residual..... 25
4.4. Doseamento de potássio residual..... 25
4.5. Animais..... 26
4.6. Procedimento cirúrgico para avaliação cardiovascular..... 26
4.7. Aquisição e análise dos sinais de eletrocardiograma e pressão arterial..... 26

4.8. Protocolos experimentais..... 27
4.9. Análise histológica dos órgãos..... 29
4.10. Doseamento de antimônio total..... 30
4.11. Análise estatística..... 31
V. Resultados e Discussão..... 32
5.1. Doseamento de SbIII residual..... 32
5.2. Doseamento de potássio residual..... 33
5.3. Avaliação da toxicidade pancreática..... 34
A. Protocolo sub-agudo por até 30 dias..... 34
B. Protocolo agudo em dose única..... 35
C. Análise histológica..... 36
5.4. Avaliação da toxicidade hepática 36
A. Protocolo sub-agudo por até 30 dias..... 36
B. Protocolo agudo em dose única..... 39
C. Análise histológica..... 40
5.5. Avaliação da toxicidade renal..... 41
A. Protocolo sub-agudo por até 30 dias..... 41
B. Protocolo agudo em dose única..... 46
C. Análise histológica..... 47
5.6. Avaliação da toxicidade cardiovascular..... 47
A. Protocolo sub-agudo por até 30 dias..... 47
A1. Doseamento de CKMB..... 47
A2. Avaliação de sinais de ECG e PA 49
B. Protocolo agudo em dose única..... 55
B1. Doseamento de CKMB 55
B2. Avaliação de sinais de ECG..... 55
C. Análise histológica..... 61
5.7. Concentração sérica de Sb durante o tratamento sub-agudo..... 64
VI. Conclusão..... 65
VII.Referências bibliográficas..... 66
VIII- Anexos..... 74
8.1. Parâmetros bioquímicos..... 75
8.2. Avaliação de sinais de ECG e PA..... 78

8.3. Concentração sérica de Sb durante o tratamento sub-agudo..... 80
8.4. Representação das análises dos parâmetros cardiovasculares..... 80

I. INTRODUÇÃO

Os antimoniais antimoniato de meglumina (Glucantime®, Aventis, França) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®, Wellcome, Beckenham, R.U.) são fármacos de primeira escolha para tratar a Leishmaniose, exceto em Bihar, na Índia devido à resistência a estes fármacos (Berman, 1988, Herwaldt, 1992). Essa doença parasitária é endêmica em 88 países (Desjeux, 2005) e está associada a 2-4 milhões de casos com incapacitação de vida durante anos, além de cerca de 70.000 mortes por ano (Desjeux, 1996).

O suprimento destes antimoniais, no entanto, não é totalmente garantido nas áreas endêmicas e, devido à alta demanda, os fármacos tornam-se escassos. No sudeste do Sudão, o Pentostam® é comumente encontrado no mercado negro (Boelaert *et al.*, 2002). O alto custo do tratamento, que inclui gastos com fármaco e cuidados com o paciente, é um desafio que deve ser ultrapassado e justificaria a busca de novas alternativas para o tratamento (Marsden,1985). Além disso, a disponibilidade de produtos sintéticos pode facilitar economicamente estudos acadêmicos de fármacos antimoniais pentavalentes e propiciar o desenvolvimento de novos medicamentos (Demicheli *et al*., 2003). Neste sentido, dois simples e eficientes métodos de obtenção de antimoniato de meglumina, utilizando como fonte de antimônio pentavalente (SbV) $SbCl_5$ (produto AM) ou $KSb(OH)_6$ (produto AM1), foram desenvolvidos por Demicheli e cols (2003) e vêm sendo aplicados em diferentes estudos, uma vez que a análise dos mesmos mostrou similaridade com o fármaco comercial (Glucantime®).

A Índia e o Sudão comercializam o medicamento genérico do Pentostam® (estibogluconato de sódio), o qual é cerca de 14 vezes mais barato que o medicamento comercial (Veeken *et al.*, 2000) e estudos com este medicamento têm sido realizados devido a suspeita de maior toxicidade dos mesmos, sugerindo a necessidade de um rigoroso controle de qualidade lote a lote (Veeken *et al*., 2000; Ritmeijer *et al*., 2001; Rijal *et al.*, 2003).

Dzamitika e cols (2006) sugerem que o resíduo de antimônio trivalente no antimoniato de meglumina tem pequena influência na atividade anti-leishmanicida deste medicamento mas, por outro lado, parece ser responsável pela toxicidade contra células de mamíferos e atuar como mediador de resistência aos fármacos antimoniais via bombas de efluxo do tipo bombas de multi-resistência a fármacos (MRP).

O tratamento com os antimoniais pentavalentes é acompanhado de severos efeitos colaterais como fadiga, anormalidades no eletrocardiograma e nos níveis de transaminases, além de pancreatite e nefrotoxicidade (Ballou, Mcclain *et al.*, 1987; Herwaldt e Berman, 1992;

Desjeux, 1996; Blum, Desjeux *et al.*, 2004; Lawn, Armstrong *et al.*, 2006)

Apesar da ampla utilização de compostos antimoniais, observa-se escassez nas informações sobre os mecanismos responsáveis pelos efeitos colaterais dos antimoniais pentavalentes, principalmente no que diz respeito a Glucantime® (Sampaio, Marsden *et al.*, 1989) *et al*., 1997). Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o antimoniato de meglumina obtido por diferentes rotas sintéticas, as quais originaram diferentes teores residuais de antimônio trivalente (SbIII), quanto à toxicidade pancreática, hepática, renal e cardáca, em ratos Wistar.

II. REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, o antimoniato de metilglucamina, medicamento à base de antimônio, é a primeira escolha na terapêutica da leishmaniose e mostra-se eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LM) e leishmaniose visceral (LV) (Rath, Trivelin *et al.*, 2003). Na prática e na ausência de vacinas, o aumento da eficácia do tratamento da leishmaniose decorre da otimização dos tratamentos com medicamentos já existentes e da busca por novas terapias utilizando combinações destes medicamentos(Desjeux, 2005).

2.1. Química do Antimoniato de meglumina

Apesar do antimoniato de meglumina ser empregado no tratamento da leishmaniose por mais de 50 anos, só recentemente a estrutura e composição do composto foram elucidadas através de espectrometria de massas e medidas de osmolaridade. No antimoniato de meglumina, o Sb foi identificado complexado à metil glucamina nas estequiometrias 1:1, 1:2, 2:2 e 2:3 sendo que, em soluções concentradas presentes nas preparações comerciais, a mistura predominante consiste de complexos Sb-meglumina de estequiometria 2:2, 2:3 e 2:1 (Frézard *et al.*, 2008).

O estibogluconato de sódio e o antimoniato de N-metil glucamina possuem eficácia equivalente, pois são da mesma classe farmacológica e parecem apresentar mecanismos de ação e farmacocinética semelhantes (Lima, Porto *et al.*, 2007). Segundo Berhe e colaboradores (cols) (2001), os estudos utilizando estibogluconato de sódio podem ser aplicados ao antimoniato de meglumina pois ambos os fármacos possuem similar farmacocinética quando administrada quantidade equivalente de antimônio pentavalente (SbV). As Figuras 1 e 2 ilustram as estruturas químicas sugeridas para estes compostos.

O antimoniato de meglumina é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico do N-metil-glucamina (Figura 1), sendo este obtido previamente a partir da aminação redutora da glicose em presença de metilamina. O composto, de fórmula estrutural não definida, é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos(Rath, Trivelin *et al.*, 2003).

Demicheli e cols (1999) propuseram que o antimônio se liga ao N-metil glucamina através do oxigênio do carbono 3 demonstrando ainda que na faixa de pH entre 4,5 e 7,5, o

complexo antimoniato de meglumina existe na forma zwitérica devido ao grupo amino e o grupo antimônico–ácido.

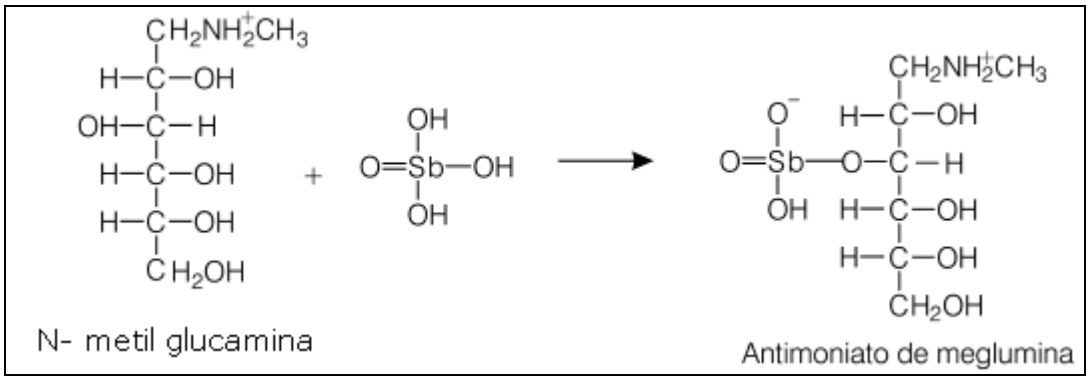


Figura 1: Formação e estrutura química proposta do antimoniato de meglumina

Fonte: (Demicheli, De Figueiredo *et al.*, 1999)

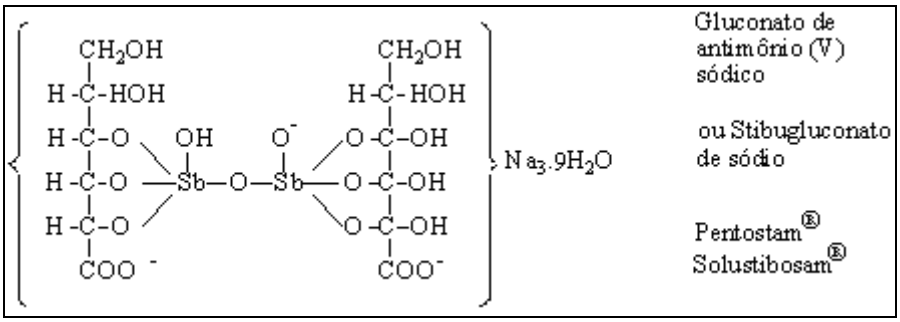


Figura 2: Fórmula estrutural proposta para estibogluconato de sódio

Fonte: Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose:Estado da Arte (Rath, Trivelin *et al.*, 2003)

Dzamitika e cols (2006) demonstraram através de experimentos *in vitro* que o sal de antimoniato de potássio ($KSb(OH)_6$) foi mais tóxico para células mamíferas que o antimoniato de meglumina, indicando que a complexação do antimônio pentavalente reduziria a toxicidade do mesmo (Dzamitika, Falcao *et al.*, 2006).

Glucantime® e Pentostam® apresentam-se como um pó branco e solúvel em água, sendo que para melhor armazenamento, recomenda-se não exposição à luz (Marsden, 1985). A solução de Glucantime® é comercializada em ampolas de 5 ml contendo 1,5 gramas do antimoniato de meglumina e 425 mg de SbV, o que corresponde a 85 mg/ml de antimônio pentavalente, enquanto o estibogluconato de sódio é apresentado em frascos de 100 ml com cerca de 100 mg/ml. A apresentação em ampolas é menos sujeita a contaminação microbiana devido ao freqüente manuseio para aplicações do fármaco (Marsden, 1985).

2.2. Novas formas de obtenção de antimoniato de meglumina

A disponibilidade de produtos sintéticos pode facilitar estudos acadêmicos mais extensos sobre o antimoniato de meglumina e colaborar com a aceleração e desenvolvimento de novas terapias alternativas (Demicheli, Ochoa *et al.*, 2003).

Uma forma genérica do estibogluconato de sódio é atualmente produzido por Albert David Ltda, Calcutá, Índia o qual não parece apresentar diferença com o fármaco de marca, a não ser em relação ao preço: o medicamento genérico é cerca de cinco vezes mais barato que o de marca (Desjeux, 1996; Guerin, Olliaro *et al.*, 2002).

Já segundo Veeken e cols (2000), o genérico de estibogluconato de sódio custa apenas 1/14 do preço do Pentostam®, sendo este muitas vezes disponível informalmente no leste da África, contribuindo com inadequado uso e terapia. Em um estudo realizado pelos mesmos pesquisadores com 271 pacientes tratados com Pentostam® e 245 com genérico de estibogluconato de sódio não foram observadas diferenças entre os dois grupos. Assim, como ocorreu com o estibogluconato de sódio, a descoberta de genérico para o antimoniato de meglumina poderá diminuir o preço deste fármaco e facilitar o tratamento da leishmaniose

Dois simples e eficientes processos de preparação de derivados de antimoniais pentavalentes, similar ao antimoniato de meglumina, utilizando pentacloreto de antimônio ($SbCl_5$) ou hexahidroxiantimoniato de potássio ($KSb(OH)_6$) como fonte de SbV, foram propostos por pesquisadores brasileiros Demicheli e cols (2003).

2.3. Farmacocinética dos compostos antimoniais pentavalentes

Uma injeção intramuscular de 10 mg/kg de Sb em humanos (na forma de estibogluconato de sódio ou antimoniato de meglumina) alcança picos sanguíneos na concentração de 9-12 mg/L após 2 horas administração. A maior parte do Sb é eliminada rapidamente, mas a concentração aumenta gradualmente nos tecidos depois de repetidas doses (Berman, 1988; Chulay, Fleckenstein *et al.*, 1988; Davidson, 1998), indicando um acúmulo do fármaco no tratamento a longo prazo (Chulay, Fleckenstein *et al.*, 1988).

O modelo que melhor descreve a farmacocinética do antimoniato de N-metil glucamina é o modelo de dois compartimentos: o primeiro compartimento representado por um compartimento central que inclui sangue e plasma e o segundo seria um compartimento

periférico no qual o fármaco é distribuído e haveria conversão de SbV a antimônio trivalente (Sb III). Existe uma fase inicial com meia vida ($t_{½}$) de 0,85 horas, uma rápida fase de eliminação ($t_{½}$ = 2 horas) e uma lenta fase de eliminação ($t_{½}$ = 76 horas) (Chulay, Fleckenstein *et al.*, 1988). A fase lenta terminal de eliminação pode ser resultado da conversão *in vivo* de SbV a Sb III, o que pode ser atribuído à toxicidade e eficácia do fármaco. Em cães Beagles infectados com *l. infantum*, que receberam 75 mg/kg de Glucantime® subcutaneamente a cada 12 horas por 10 dias, observou-se uma fase de $t_{1/2}$ de absorção de 1,09 horas, com concentração máxima seguida de um rápido decréscimo no nível plasmático com $t_{½\beta}$ de 1,41 horas e uma fase terminal lenta de eliminação com $t_{½\beta}$ de 8,76 horas (Valladares, Riera *et al.*, 1998).

Em outro estudo em cães Beagles, no qual houve administração intravenosa (VIV), intramuscular (VIM) e subcutânea de 100 mg/kg Glucantime®, observou-se que a concentração plasmática é descrita por uma equação triexponencial: a primeira fase com rápida distribuição do antimônio ($t_{½}$ k01A de 40 minutos e $t_{½}$ α =9,4 min), alcançando concentração máxima ($C_{máx}$) em 80 minutos pós administração; a segunda fase intermediária ($t_{½\ \beta}$ = 45,3 min) consistiria na conversão do antimônio pentavalente em trivalente no fígado e rápida excreção renal do antimônio pentavalente; já a terceira fase lenta ($t_{½\ \gamma}$ = 618min) corresponderia à eliminação renal de antimônio na forma trivalente. A fase lenta de eliminação pode corresponder à afinidade de antimônio trivalente pelos eritrócitos e por alguns tecidos; como a maior porcentagem do fármaco é excretada nas primeiras 9 horas, cerca de 20% do antimoniato seria excretado lentamente (Valladares, Alberola *et al.*, 1996).

A principal via de eliminação do estibogluconato de sódio é a renal (Nieto, Alvar *et al.*, 2003), sendo o clearance similar ao da inulina com taxa de filtração glomerular de 120 mL/ min, talvez sem reabsorção e secreção pelos túbulos renais. A avaliação na função renal deve sempre ser realizada durante o tratamento com este fármaco e caso haja anormalidades, deve-se fazer ajustes de dosagens, se necessário(Rees, Keating *et al.*, 1980)

Na pele, há uma rápida penetração do Sb, porém a disponibilidade é lenta quando comparada à sanguínea (Al Jaser, El-Yazigi *et al.*, 1995). Brochu e cols (2003) sugerem que o antimônio pentavalente e o trivalente não penetram na célula através da mesma rota, pois existe inibição competitiva entre AsIII e SbIII, mas não há modificação no acúmulo de SbV na presença de AsIII.

2.4. Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes

Por mais de sete décadas, compostos antimoniais pentavalentes vêm sendo a primeira escolha para o tratamento de leishmaniose, porém o mecanismo preciso de ação desses compostos permanece um enigma (Haimeur, Brochu *et al.*, 2000; Demicheli, Frezard *et al.*, 2002; Sundar e Chatterjee, 2006; Lima, Porto *et al.*, 2007).

Há a hipótese de que o mecanismo de ação ocorra por inibição dos adenosina (ATP) e guanosina trifosfatos (GTP ou AGP) (Berman, 1988), através do bloqueio da atividade glicolítica e oxidativa de ácidos graxos de amastigotas, uma vez que esta diminui a capacidade de fosforilação de ADP a ATP levando à depleção de ATP intracelular (Berman, 1988); Koff e Rosen, 1994).

Outra hipótese compreende a possível conversão do antimonial pentavalente, uma espécie de pró-fármaco, a forma trivalente (SbIII) (Sereno, Cavaleyra *et al.*, 1998; Haimeur, Brochu *et al.*, 2000; Kothari, Kumar *et al.*, 2007; Lima, Porto *et al.*, 2007); esta hipótese é sustentada pelo fato de existir alta toxicidade de antimônio trivalente aos estágios do parasito (Sereno, Holzmuller *et al.*, 2001) e apenas a forma amastigota ser susceptível ao antimônio pentavalente (Denton, Mcgregor *et al.*, 2004). Além disso, o tartarato de potássio (SbIII) mostra-se mais ativo contra amastigotas axênicos de *l. infantum* que compostos antimoniais pentavalentes (Sereno, Cavaleyra *et al.*, 1998) A forma amastigota, em *l. infantum*, é cerca de 15 vezes mais susceptível ao SbIII que a forma promastigota mesmo com maior entrada de SbIII nessa última forma (Brochu, Wang *et al.*, 2003). Já no estudo *in vitro* de Roberts e cols (1995), observou-se que IC_{50} de compostos antimoniais foram 60 a 600 vezes maior para promastigotas que para amastigotas e o macrófago seria uma reserva desses compostos que prolongaria a exposição do parasito ao fármaco.

Uma enzima específica ao parasito *Leishmania* parece ser a responsável pela conversão do SbV a SbIII, tal enzima redutase dependente de tiol (TDR1) utiliza glutationa (GSH) como redutor, apresentando massa de aproximadamente 155 kDa e correspondendo a um trímero sendo cerca de 10 vezes mais expressa em amastigotas que em promastigotas (Denton, Mcgregor *et al.*, 2004). Por outro lado, alguns autores sugerem que cisteína (Cys) e cisteína-glicina (Cys-Gly), principais tióis dos compartimentos ácidos de células de mamíferos e a tripanotiona (tiol específico do parasito leishmania-$T(SH)_2$), seriam os principais responsáveis pela redução de SbV a SbIII e não o GSH (glutationa) e, ainda, que tal conversão seria favorecida em pH ácido, similar aos fagolisossomos de macrófagos, local onde a leishmania reside (Ferreira Cdos, Martins *et al.*, 2003; De Oliveira, Schettini *et al.*, 2006)

Wyllie e cols (2004) acreditam que o SbIII (assim como os compostos antimoniais pentavalentes após conversão de SbV a SbIII) atuaria no potencial de redução dos tióis,

importante na manutenção da função celular e na defesa contra o estresse oxidativo, diminuindo, assim, a capacidade de tamponamento intracelular dos tióis, através da perda de tripanotiona e glutationa intracelular pela rápida indução de efluxo dos mesmos, e, ao mesmo tempo, aumentando a concentração intracelular das formas dissulfídicas desses tióis pela inibição da tripanotiona redutase.

Quanto a possível atuação do SbV, ribonucleosídeos podem ser o alvo almejado deste metal no tratamento da leishmaniose, uma vez que o SbV interage através de mono e di–associações, com biomoléculas de adenina e guanina ribonucleosídeos, as quais existem em grandes quantidades em fagolisossomos, locais onde o parasito reside e se multiplica. Tal associação parece ser favorecida por pH ácido, o qual está presente nos fagolisossomos (Demicheli, Frezard *et al.*, 2002; Dos Santos Ferreira, De Castro Pimenta *et al.*, 2006). Lucumi e cols (1998) mostraram que os compostos antimoniais pentavalentes atuariam sobre a topoisomerase resultando na estabilização de complexos DNA-proteínas e que cepas de *l.(Viannia) panamensis*, resistentes a antimoniais, perdem a capacidade de estabilizar complexos de clivagem DNA-protéicos *in vitro*. Outros pesquisadores acreditam que a fragmentação do DNA pode ser devido ao envolvimento de canais de Ca^{2+} com influxo deste íon levando à formação de espécies oxidantes muito reativas (Sudhandiran e Shaha, 2003), e ainda que os antimoniais possam induzir apoptose através da fragmentação de DNA como demonstrado em formas amastigotas axênicas de *l. infantum*, sendo que esta apoptose não envolveria capaínas, proteasoma ou cisteína protease, sendo uma apoptose não metazoária sem interferência com uso concomitante de inibidor de caspases (Sereno, Holzmuller *et al.*, 2001).

2.5. Resistência ao tratamento com o uso de antimoniais

A resistência primária ao uso de compostos antimoniais ocorre extensivamente em Bihar, na Índia, onde aproximadamente 30% dos pacientes com LV mostram-se não responsivos a estes fármacos (Davidson, 1998; Lima, Porto *et al.*, 2007).

Diferentes autores sugerem mecanismos prováveis de resistência aos compostos antimoniais, dentre eles podem ser citados: a redução da capacidade de conversão do SbV em SbIII (Denton, Mcgregor *et al.*, 2004); a formação de conjugado entre Sb e o tiol intracelular (tripanotiona (TSH)) por conjugase/transferase não identificadas; e a extrusão de Sb por transportadores de efluxo ABC (Lima, Porto *et al.*, 2007). Esta resistência ao SbIII parece ser semelhante ao arsenito e podendo também ocorrer resistência cruzada do SbIII com o AsIII

(Haimeur, Brochu *et al.*, 2000).

Por outro lado, o tratamento incompleto ou sub-dose da terapia por pacientes em locais com focos endêmicos, podem resultar no aparecimento de L*eishmania* com baixa sensibilidade aos antimoniais pentavalentes (Lucumi, Robledo *et al.*, 1998). Também a inerente resistência do parasito ao antimonial ou defeitos sutis na farmacocinética ou sistema imune do hospedeiro podem ser importantes (Berman, 1988). Desjeux (2005) afirmou haver cerca de 60% de não responsivos ao SbV em Bihar, na Índia, onde recomenda-se prolongado tratamento com antimoniais e uso de fármacos alternativos.

Sereno e cols (1998) observaram que existe resistência cruzada *in vitro* em amastigotas axênicos de *l. infantum* entre SbIII e antimoniato de meglumina, a qual pode ser favorecida diretamente pela pressão exercida pelo amplo uso do fármaco. Em 2006, Dzamitika e cols (2006) sugeriram que o SbIII residual do antimoniato de meglumina seria o responsável pela toxicidade sobre as células de mamíferos e não sobre as células do parasito *Leishmania*; e ainda que existiria resistência mediada por proteína de mamíferos associada à resistência a multi-fármacos (MRP1) induzida apenas pelo SbIII e não pelo SbV.

Os níveis de TSH estão aumentados em cepas resistentes ao SbIII e este aumento parece ser mediado parcialmente por amplificação de GSH1, que também encontra-se aumentado nestas cepas resistentes. Também é observado em cepas resistentes ao SbIII, amplificação do gene que codifica PGP, um transportador intracelular metal-TSH. A transfecção de gene PGPA provoca resistência, mostrando a provável importância deste gene no mecanismo de resistência ao SbIII. Enfim, parece que a *Leishmania* requer para o mecanismo de resistência: elevado nível de tióis, transportadores (PGPA) e conjugase/transferase para conjugar metais ao TSH (Haimeur, Brochu *et al.*, 2000).

A existência de um gene PG1 em *L. donovani* que codificaria uma proteína de membrana e não um transportador sugere que a membrana plasmática seja o sítio de ação pelo qual o fármaco penetre na célula e uma significante modificação nessa membrana do parasito levaria à resistência aos antimoniais (Kothari, Kumar *et al.*, 2007).

Na Índia, não há reservas zoonóticas na LV e, apenas um ciclo antroponótico que envolve transmissão de humano a humano, o que contribui com um emergente aumento de pacientes com parasitos refratários à terapia com antimoniais. Além disso, foi observado que em Bihar de 312 pacientes que receberam antimoniais e tiveram falha no tratamento, apenas 26% foram tratados de acordo com o recomendado pela OMS (Sundar, 2001).

A resistência aos antimoniais é ameaçadora e a tendência atual é testar a terapia combinada, visando aumentar também a eficácia do tratamento. (Guerin, Olliaro *et al.*, 2002;

Lima, Porto *et al.*, 2007).

A Figura 3 descreve resumidamente alguns importantes aspectos do mecanismo de ação e resistência dos antimoniais:

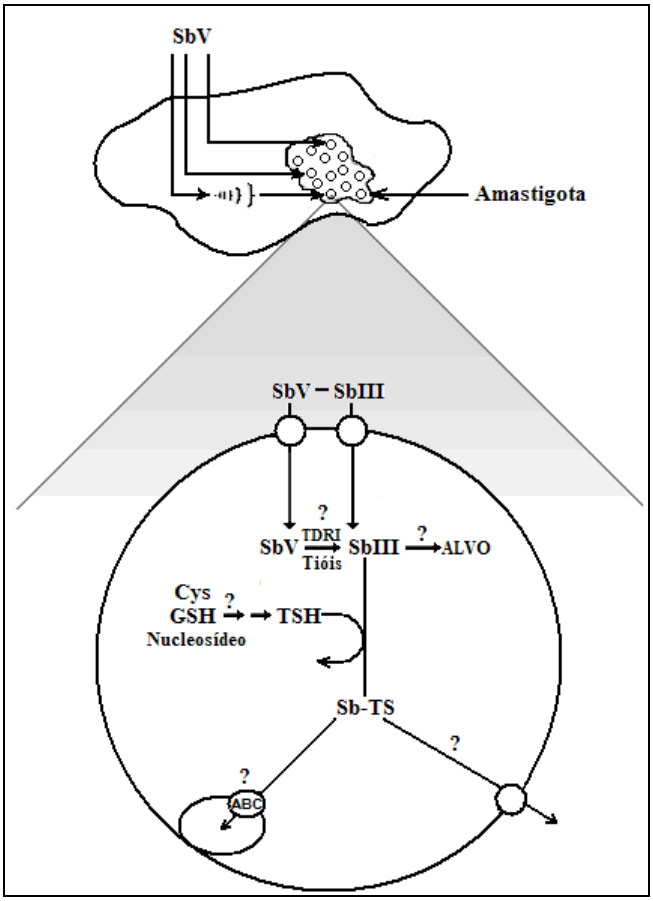


Figura 3: Mecanismo de ação e resistência dos antimoniais pentavalentes em amastigotas de *Leishmania*. Antimoniais pentavalentes (SbV) penetram nos macrófagos ou nas formas amastigotas parasitos podendo ser reduzido à forma trivalente no citosol ou no fagolisossomo. Essa redução pode ocorrer por TDR1 redutase ou por tióis e, SbIII interageria diretamente com o alvo ou indiretamente através de conjugados tióis como a cisteína, glutationa ou tripanotiona. Quando há resistência, o nível de tripanotiona aumentaria e haveria maior conjugação deste com Sb que é seqüestrado por transportadores de efluxo do tipo ABC.

Adaptado: Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. Marc Ouellette, Jolyne Drummelsmith, Barbara Papadopoulou (2004)

2.6. Uso terapêutico na leishmaniose

Antimoniais têm sido utilizados por milênios em preparações tópicas e em glóbulos de vinho desde a Idade Média (Berman, 1988).

O Sb trivalente (SbIII), tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio) foi introduzido no Brasil por Gaspar Vianna em 1912 para o tratamento da forma mucocutânea da leishmaniose (Berman, 1988; Lima, Porto *et al.*, 2007). A partir dos trabalhos deste importante

médico brasileiro, os pacientes com leishmaniose visceral passaram a ter esperança de sobrevivência (Demicheli e Frézard, 2005). Antimoniais trivalentes também foram utilizados na terapia de esquistossomose, porém apresentavam muitos efeitos colaterais e por isto entraram em desuso (Chulay, Spencer *et al.*, 1985; Henderson e Jolliffe, 1985; Berman, 1988). Alterações como distúrbios gastrintestinais e cardiotoxicidade no tratamento da esquistossomose eram vistas com o uso de tartarato emético, dimercaptosuccinato de sódio, gluconato antimonial trivalente de sódio, ocorrendo durante a primeira semana de tratamento e mesmo com doses baixas (Chulay, Spencer *et al.*, 1985). A Tabela 1 apresenta as estruturas antimoniais trivalentes.

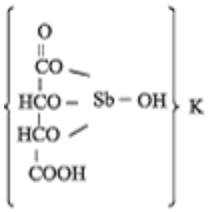
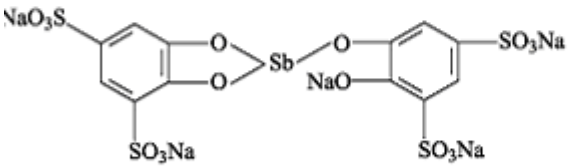
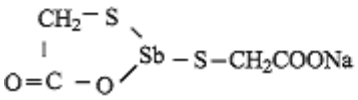
Fórmula estrutural	Nome químico/ Nome comercial
	Tartarato de antimônio e potássio Tártaro emético
	Antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico Stibophen, Repodral, Fuadina
	Tioglicolato de sódio e antimônio

Tabela 1: Estruturas químicas de antimoniais trivalentes empregados na clínica médica, com os respectivos nomes químicos e comerciais.
Fonte: Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da Arte(Rath, Trivelin *et al.*, 2003)

Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos na terapêutica antes da Segunda Guerra Mundial e permanecem como base do tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral (Veiga, Rosa *et al.*, 1985). Bramachari, em 1920, desenvolveu o primeiro composto à base de antimônio pentavalente, o uréia estibamina, derivado uréico do ácido p-aminofenil estibínico. Em 1936, Schimdt introduziu na terapia médica o gluconato de antimônio(V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan® (Bayer) ou Pentostam® (Glaxo Wellcome) que tinha a vantagem de poder ser estocado até sua utilização, devido maior estabilidade em solução aquosa (Soares-Bezerra, José; *et al.*, 2004). Durante a Segunda Guerra Mundial, surgiu na França, uma alternativa ao gluconato de antimônio (V) sódico, o antimoniato de N-metil meglumina,

comercializado como Glucantime® (Rhône-poulene-Rohrer) ou antimoniato de meglumina (Rath, Trivelin *et al.*, 2003). Atualmente, o Glucantime® é produzido no Brasil pelo laboratório Rhodia (Marsden, 1985).

Segundo Rath e cols (2003), os antimoniais pentavalentes são geralmente 10 vezes menos tóxicos que os antimoniais trivalentes (tártaro emético), utilizados primeiramente por Vianna em 1912 e, por isso, possuem maior índice terapêutico (Roberts, Berman *et al.*, 1995). Por outro lado, a cardiotoxicidade desses agentes é qualitativamente similar aos agentes antimoniais trivalentes(Berman, 1988).

Desde 1968, Pentostam® encontra-se disponível nos Estados Unidos nos Centros de Controle de Doenças (CDC) como fármaco para tratamento de leishmaniose (Herwaldt e Berman, 1992). Até 1970, compostos antimoniais pentavalentes eram administrados intramuscularmente por dois períodos de 6 a 10 dias com intervalo de 10 dias entre estes. (Manson-Bahr, 1971; Thakur, Sinha *et al.*, 1998; Sundar, 2001). No mesmo ano, cerca de 30% dos pacientes com LV em Bihar já eram não responsivos ao antimônio pentavalente (Peters, 1981). Assim, foi aumentado o tempo de duração do tratamento de 6-10 dias para 20 dias ou mais, o que melhorou a resposta dos pacientes em Bihar (Thakur, Kumar *et al.*, 1988; Sundar, 2001). Em seguida, a OMS (1990) estabeleceu o regime de tratamento para 30 dias com 20 mg/kg/dia para LV (Sundar, 2001).

Estudos como de Thakur e cols (1984) mostraram que o protocolo de 6 dias de tratamento para kalazar era inadequado e uma duração de terapia por mais de 20 dias seria o recomendado e bem tolerado. Em 1982, a dose é aumentada de 10 para 20 mg/kg/dia com um limite superior de 850 mg/Sb/dia para o tratamento de leishmaniose visceral e repetição deste regime por 20 dias em caso de falhas (Herwaldt e Berman, 1992; Sundar, 2001; Blum, Desjeux *et al.*, 2004). Assim, a dose recomendada para o tratamento de LV, LC e LM até 1992, era de 20 mg/kg/ dia de SbV até o máximo de 850 mg de Sb por dia (Ballou, Mcclain *et al.*, 1987; Berman, 1997). No entanto, o limite superior de 850 mg SbV/dia foi abandonado em 1990 (Blum, Desjeux *et al.*, 2004).

O antimoniato de meglumina é especialmente eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a esterilização do parasito (Rath, Trivelin *et al.*, 2003).

Historicamente, o estibogluconato de sódio (Pentostam®) é predominantemente usado por países que falam inglês e o antimoniato de n-metil glucamina (Glucantime®) por países que não falam inglês (Lawn, Armstrong *et al.*, 2006). Tais fármacos só existem na forma parenteral

(Blum, Desjeux *et al.*, 2004).

O tratamento sistêmico recente pode prevenir lesões mucosas na LC, fato observado principalmente em pacientes que abandonaram ou receberam tratamento incompleto com antimoniais (Blum, Desjeux *et al.*, 2004).

A posologia deve ser calculada em mg de SbV/kg, para uniformizar o tratamento. Deve ser administrado preferencialmente pela via endovenosa (VIV) por injeção lenta durante 5 minutos e pode ser administrado pela via intramuscular (VIM) na região glútea (MS, Brasil, 2004). É recomendado a dose de 20 mg SbV/kg/dia uma vez ao dia por 20 a 40 dias para o tratamento de LV e 15 mg/kg/dia por 20 dias para LC (MS, Brasil, 2006a, b).

Segundo Sampaio e cols (1980) em 51 pacientes com leishmaniose tegumentar, a cura clínica foi de 100% para as formas cutâneas e 75% para as formas mucosas e 0,7% dos pacientes não relataram efeitos colaterais com o esquema terapêutico de 1,0 grama de Glucantime® por quilo por série, repetidas vezes com intervalos de 15 a 30 dias.

Outro trabalho de Sampaio e cols (1989) comparando três esquemas de tratamento de LMC com antimoniais pentavalentes, mostrou que o esquema de 20 mg SbV/kg/dia por 30 dias apresentou melhores resultados na leishmaniose mucosa quando comparado aos esquemas com Pentostam® 10 mg/kg/dia de SbV por 30 dias ou Glucantime® com 28 mg/kg/dia por 10 a 12 dias, em três séries com intervalo de 15 dias (Sampaio, Marsden *et al.*, 1989).

Quanto à outras possibilidades de tratamento para a leishmaniose deve ser ressaltado que tem sido recomendado somente em caso de contra-indicações, intolerância e resistência aos antimoniais (Lima, Porto *et al.*, 2007), pois os fármacos considerados de segunda linha também podem apresentar toxicidade, não curar e manifestar resistência (Lima, Porto *et al.*, 2007). Além disso pentamidina e anfotericina B, fármacos alternativos, são mais tóxicos e de difícil administração (Guerin, Olliaro *et al.*, 2002).

Outras alternativas vêm sendo pesquisadas como aminoglicosídeo paramomicina, fármacos adjuvantes como interferon gama, novos modelos de fármacos (via tópica, lipossomos) e até vacinas (Berman, 1997; Davidson, 1998). No entanto, interferon gama e pentamidina também são fármacos potencialmente tóxicos, necessitando muito cuidado na sua utilização (Thakur, Sinha *et al.*, 1998).

O crescimento da resistência do parasito aos fármacos antileishmaniais sugerem que a monoterapia deve ser revista e a combinação quimioterapêutica de fármacos já existentes pode ser a chave para "frear" a resistência do parasito a estes fármacos e diminuir o tempo de duração do tratamento (Sundar, 2001; Guerin, Olliaro *et al.*, 2002).

2.7. Toxicidade dos agentes antimoniais

Mesmos sendo os antimoniais, fármacos altamente efetivos, possuem problemas em sua aplicação na terapêutica da leishmaniose, tais como: administração parenteral, terapia de longa duração (semanas), efeitos subótimos em alguns casos, freqüentes casos de reversibilidade da doença, além de efeitos colaterais como fadiga, anormalidades no eletrocardiograma e nos níveis de transaminases, além de pancreatite (Ballou, Mcclain *et al.*, 1987; Herwaldt e Berman, 1992; Desjeux, 1996; Blum, Desjeux *et al.*, 2004; Lawn, Armstrong *et al.*, 2006). Também é descrito a ocorrência de letargia, dores de cabeça, náusea, vômito, gosto metálico e prurido (Davidson, 1998). Assim, algumas situações exigem vigilância rigorosa como em pacientes com idade superior a 50 anos, portadores de cardiopatia, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas, recomendando-se, nesses casos, acompanhamento com eletrocardiograma (ECG) e avaliação semanal da função renal (Lima, Oliveira *et al.*, 2007).

Trabalhos são encontrados na literatura sobre avaliação de eficácia e toxicidade dos compostos antimoniais. Deps e cols (2000) relatam resultados de um ensaio clínico realizado para comparar a eficácia e toxicidade do antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio na dose de 15 mg SbV/kg/dia por 20 dias, tendo observado que a eficácia similar de ambos apesar do grupo tratado com estibogluconato de sódio ter apresentado maior toxicidade, uma vez que os níveis de ALT, AST, amilase e lipase foram significativamente maiores para este grupo.

Em um estudo com hamsters infectados com leishmaniose cutânea americana (LCA) e tratados com as doses de 30, 60 ou 120 mg de SbV/kg/dia durante 20 dias com Pentostam® ou Glucantime® VIM, foi observado que o efeito de ambos os fármacos é dose dependente. Além disso, neste mesmo trabalho os animais foram tratados por 20 dias com as doses de 120, 160 ou 240 mg SbV/kg/dia com os compostos antimoniais pentavalentes para avaliação da toxicidade e efeitos colaterais dos fármacos, nos dias 0, 5, 10 e 20 de tratamento, além de 15 dias após o término do mesmo, sendo que os resultados não mostraram diferenças significativas em relação ao grupo sem tratamento nos valores séricos de ALT, AST, amilase e creatinina. Entretanto, o Pentostam® mostrou maior toxicidade que o Glucantime® em relação às alterações produzidas no sítio da injeção e pelo aumento nos valores da enzima creatino quinase (CK) (Henao, Osorio *et al.*, 2004).

2.7.1. Alterações Hepáticas

Aumento nos teores das enzimas hepáticas tem sido observado em pacientes com o uso de compostos antimoniais (Chulay, Anzeze *et al.*, 1983; Lawn, Armstrong *et al.*, 2006; Lima, Porto *et al.*, 2007). Elevações de duas a três vezes em relação aos valores basais antes do tratamento são freqüentemente observados durante a terapia (Berman, 1988).

A disfunção hepática é comum em pacientes que apresentam hipoalbuminemia com edema ou ascite (Davidson, 1998). Estibogluconato de sódio está associado a danos hepáticos agudos e diminuição na capacidade funcional metabólica do fígado, as quais são normalmente reversíveis com interrupção do tratamento (Hepburn, Siddique *et al.*, 1993). Ainda em relação à hepatotoxicidade induzida pelo estibogluconato de sódio, Ballou e cols (1987) observaram em pacientes com LCA causada por *leishmania braziliensis panamensis* e tratados com 10 ou 20 mg Sb/kg/dia por 20 dias, aumento sérico de aminotransferases, com maior magnitude no grupo que recebeu a dose maior, porém as diferenças entre os dois grupos não foram significativas e mostraram-se reversíveis após interrupção da terapia.

Estudo realizado por Alkhawajah e cols (1992) mostrou aumento no nível de fosfatase alcalina em ratos tratados por 30 dias com a dose de 300 mg/kg de antimoniato de meglumina e, aumento de aspartato aminotransferase (AST) e aspartato alaninatransferase (ALT) em animais tratados com estibogluconato de sódio na mesma dose.

Ikeda-Garcia e cols (2007) observaram aumento de ALT, AST e fosfatase alcalina em cães após 30 dias de tratamento com 75 mg/kg de antimoniato de meglumina, mas com ausência de sinais clínicos.

Aumento nos índices de aminotransferases usualmente não limita a terapia, porém se o aumento alcançar 5 vezes o limiar normal, recomenda-se descontinuação do tratamento. Recomenda-se também o não consumo de álcool no decorrer da terapia (Herwaldt e Berman, 1992).

2.7.2. Alterações pancreáticas

Em um estudo realizado com 65 viajantes britânicos diagnosticados com parasitos do subgênero *L (Viannia),* assintomática hiperamilasemia foi observada em 67% dos pacientes que utilizaram, 20 mg/kg de SbV Pentostam® uma vez ao dia por 21 (LC) ou 28 (LM) dias, principalmente após a segunda semana de tratamento (Lawn, Armstrong *et al.*, 2006).

Ensaio clínico realizado por Deps e cols (2000) com 63 pacientes recebendo 15 mg SbV/kg/dia de estibogluconato de sódio ou antimoniato de meglumina por 20 dias, revelou toxicidade pancreática através do aumento dos níveis de amilase e lipase nos dois grupos terapêuticos.

Estudo realizado com 25 pacientes coinfectados com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e LV e tratados com duas doses diárias de 20 mg/kg de SbV contidos no antimoniato de meglumina, por VIM, durante 28 dias, sem restrição de dose máxima, resultou em morte por pancreatite aguda em 12% dos pacientes. Como estes pacientes recebiam concomitantemente outros fármacos, tóxicos para pâncreas e rins, pode ter ocorrido um aumento da toxicidade pancreática que justificariam os óbitos, porém esses dados revelam a necessidade de um estrito monitoramento do uso de antimoniais em pacientes HIV positivos, os quais estão em tratamentos com outros fármacos (Delgado, Macias *et al.*, 1999). McBride e cols (1995) recomendam o monitoramento da terapia com antimoniais pentavalentes através de exames de avaliação de níveis de amilase principalmente em pacientes imunossuprimidos.

2.7.3.Alterações Renais

Os compostos antimoniais alteram reversivelmente a capacidade de concentração urinária, porém o mecanismo de ação ainda está sob investigação (Veiga, Rosa *et al.*, 1985).

Goodwin e cols (1943) apontaram a membrana tubular como sítio de predição dos efeitos funcionais dos metais pesados no rim, embora estes formem complexos intracelulares com proteínas.

O tratamento de ratos com antimoniais pentavalentes na dose de 30 mg/kg do antimoniato de meglumina ou estibogluconato de sódio, durante trinta dias, induziu disfunção tubular caracterizada por diminuição da capacidade de concentração urinária, porém tais alterações parecem ser reversíveis após suspensão do uso desses fármacos e, nessa dose não foram observadas alterações histopatológicas renais. Por outro lado, a dose de 200 mg/100g/dia do Pentostam® induziu alterações histopatológicas renais na medida em que demonstrou necrose aguda tubular (Veiga, Khanam *et al.*, 1990).

Um relato de caso em um paciente de 60 anos mostrou quadro de insuficiência renal aguda, com necrose tubular acompanhada de aumento plasmático de uréia, creatinina, proteinúria e queda da depuração de creatinina com o uso de 30 gramas de Glucantime®/dia. A biópsia renal revelou aspecto histopatológico de acometimento renal caracterizado por agressão

e necrose dos túbulos renais. No entanto, com a suspensão da terapia, o quadro de disfunção renal retornou à normalidade (Cuce, Belda Junior *et al.*, 1990). Outro relato de caso em um paciente masculino de 50 anos com leishmaniose cutânea generalizada mostrou necrose tubular aguda com a administração de Glucantime® após 15 dias de tratamento seguido de óbito (Rodrigues, Costa *et al.*, 1999)

Sampaio e cols (1980) observaram um caso de insuficiência renal aguda com o uso de Glucantime® na dose de 33 gramas, mas o paciente não chegou ao óbito(Sampaio, Rocha *et al.*, 1980). Estudo realizado com antimonial pentavalente na dose de 40 mg SbV/kg/dia mostrou efeitos nefrotóxicos através da diminuição da depuração de creatinina, elevação da fração de excreção de sódio e diminuição na capacidade de concentração urinária (Sampaio, De Paula *et al.*, 1997)

O clearance renal do estibogluconato de sódio parece ser similar ao clearance da inulina com taxa de filtração glomerular de 120 mL/ min, talvez sem reabsorção e secreção pelos túbulos renais. A avaliação na função renal deve ser realizada e caso haja anormalidades, deve-se fazer ajustes de dosagens, se necessário (Rees, Keating *et al.*, 1980).

2.7.4. Alterações cardiovasculares

Entre 1995-1996, em Bihar, mais pacientes morreram aparentemente devido à toxicidade do antimônio que pela leishmaniose (Thakur, Sinha *et al.*, 1998)Baixas doses de antimoniato de meglumina têm sido amplamente utilizadas no tratamento de LC no Brasil durante as últimas décadas, apesar disso, estudos brasileiros sobre cardiotoxicidade de antimoniais pentavalentes são escassos. Ribeiro e cols (1999) apontaram a cardiotoxicidade, relacionada a altas doses e a duração do tratamento como o efeito colateral mais freqüente com o uso do antimonial pentavalente.

Segundo o Ministério da Saúde (2006), o principal efeito adverso do antimoniato de meglumina é decorrente de sua ação sobre o sistema cardiovascular. Esse efeito é dependente da dose e do tempo de utilização e se traduz por distúrbios de repolarização, como inversão e achatamento da onda T e aumento do intervalo QTc no eletrocardiograma (ECG). Em pacientes acima de 50 anos, precedendo ao tratamento, devem ser realizados o ECG e o acompanhamento com ausculta cardíaca, objetivando detectar arritmias. Caso essas ocorram, o tratamento deve ser imediatamente interrompido, e, após reavaliação do paciente, deve ser reiniciado o tratamento com o mesmo fármaco ou com alternativas terapêuticas (MS, Brasil, 2006).

Alterações no ECG foram observadas com o uso de estibogluconato de sódio, como prolongamento de intervalo QTc, inversão da onda T e achatamento de segmento ST (Henderson e Jolliffe, 1985; Thakur, Sinha *et al.*, 1998; Lawn, Armstrong *et al.*, 2006). Tais alterações são mais comuns em pacientes que desenvolveram arritmia com o uso do fármaco. O prolongamento QTc e mudanças no segmento ST precedem ou são preditivas de séria cardiotoxicidade como arritmia e morte e também parece estar associado ao acúmulo do total de doses de SbV (Chulay, Spencer *et al.*, 1985; Thakur, Sinha *et al.*, 1998; Lawn, Armstrong *et al.*, 2006). Taquiarritimias ventriculares estão associadas inexplicavelmente a morte súbita e têm sido relatadas em alguns pacientes que utilizam antimoniais (Segura e Garcia-Bolao, 1999). Alterações eletrocardiográficas induzidas por baixas doses de antimoniato de meglumina são principalmente relacionadas às alterações na repolarização ventricular (Ribeiro, Drummond *et al.*, 1999)A dose de 75 mg/kg/dia de antimoniato de meglumina e uso concomitante com amiodarona, também provocou prolongamento de intervalo QTc e *torsades pointes*, porém, com a interrupção do tratamento, o quadro foi revertido (Segura e Garcia-Bolao, 1999). Cuidados especiais são recomendados com o uso de antimoniais pentavalentes concomitantemente ao uso de outros fármacos que aumentam o intervalo QTc (Ribeiro, Drummond *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação que provoca anormalidades no ECG pelo uso dos antimoniais ainda não é totalmente conhecido (Chulay, Spencer *et al.*, 1985; Lima, Porto *et al.*, 2007). Um possível mecanismo determinante das alterações cardíacas se deve à inibição da desidrogenase succínica resultando na acentuada redução do uso de oxigênio pelo miocárdio (De Lacerda Junior *et al.*, 1965). Mais recentemente, um mecanismo de inibição do tráfego de canais $hERG/_{IK}$ para a superfície da célula tem sido atribuído ao trióxido de arsênio e tártaro emético(Dennis, Wang *et al.*, 2007).

Ensaio clínico randomizado com 63 pacientes recebendo 15 mg SbV/kg/dia de Pentostam® genérico ou Glucantime® por 20 dias, relatou que cerca de um quinto dos pacientes com ECG normal antes do início do tratamento apresentaram alterações ao longo do tratamento, mas nada que justificasse a interrupção do mesmo. A freqüência das alterações foram similares nos dois grupos terapêuticos avaliados e as ocorrências mais comuns foram distúrbios de repolarização e aumento do intervalo QTc (Deps, Viana *et al.*, 2000). Parecem não existir diferenças entre o uso de antimonial tri ou pentavalente (De Lacerda Junior, Ferminiani *et al.*, 1965). As alterações eletrocardiográficas são reversíveis em tempo variável, após interrupção do tratamento, porém, a dose superior a 20 mg/kg/dia de derivados antimoniais não é recomendada. (De Lacerda Junior, Ferminiani *et al.*, 1965; Thakur, 1986). E, devido ao fato do efeito colateral mais comum do antimoniato de meglumina atuar sobre o sistema

cardiovascular, o monitoramento do ECG durante o tratamento é indispensável, independente da existência de fatores de risco cardíaco (Lima, Porto *et al.*, 2007).

2.8. O Potencial de Ação e o Eletrocardiograma

A atividade elétrica da célula miocárdica compreende a sucessão cíclica de dois eventos: o potencial de repouso e o potencial de ação.

O potencial de repouso é caracterizado pela maior concentração de potássio (K^+) no meio intracelular do que no intersticial e concentração de sódio (Na^+) maior no meio intersticial do que no interior da célula. A permeabilidade ao K^+ é 50 vezes maior que ao Na^+ e o interior tem um potencial negativo em relação ao exterior. No potencial de ação, há uma inversão transitória de polaridade (positiva no interior e negativa no exterior). O potencial de ação é composto pelas seguintes fases (Figura 4):

Fase Zero: Deflexão inicial devido à rápida despolarização promovida pelo aumento transitório da condutância ao Na^+(corrente de influxo) que desloca o potencial da membrana em direção ao potencial de equilíbrio de Na^+ (+65 mV).

Fase 1: Repolarização inicial com inativação das comportas de Na^+, diminuindo a corrente e influxo deste íon e iniciando uma corrente de efluxo de K^+.

Fase 2: Platô com relativa estabilidade do potencial de membrana, onde ocorre aumento do influxo de Ca^{2+} através de uma corrente lenta.

Fase 3: Repolarização quando ocorre redução da condutância ao Ca^{2+} e aumento da condutância ao K^+.

Fase 4: Potencial de repouso da membrana quando o potencial de membrana volta a ser estável , e as correntes de efluxo e influxo se igualam e o potencial se aproxima do potencial de equilíbrio do K^+ (-85mV), refletindo alta condutância deste íon e baixa condutância de Ca^{2+} e Na^+ (Carneiro,1983).

O ECG é a medida das diferenças de potencial, na superfície do corpo, que refletem a atividade elétrica do coração (Feldman e Goldwasser, 2004). A configuração de um ECG normal é mostrada na Figura 4 e as seguintes ondas, intervalos e segmentos estão presentes no ECG:

Onda P: Representa a despolarização os átrios, sua duração está correlacionada ao tempo de condução do potencial de ação nos átrios.

Intervalo PR: È o tempo decorrido, desde a despolarização inicial dos átrios até a

despolarização inicial dos ventrículos. Assim, este intervalo inclui a onda P e o segmento PR, correspondendo à condução pelo nodo Átrio Ventricular (AV).

Complexo QRS: Corresponde ás ondas Q, R e S representando a despolarização dos ventrículos.

Onda T: representa a repolarização dos ventrículos.

Intervalo QT: Inclui o complexo QRS, o segmento ST e a onda T, representando a primeira despolarização ventricular até a última repolarização ventricular. Corresponde à sístole elétrica total ventricular (Feldman e Goldwasser, 2004).

Intervalo RR: Representa o intervalo entre duas ondas R de um segmento de ECG e determina a freqüência cardíaca.

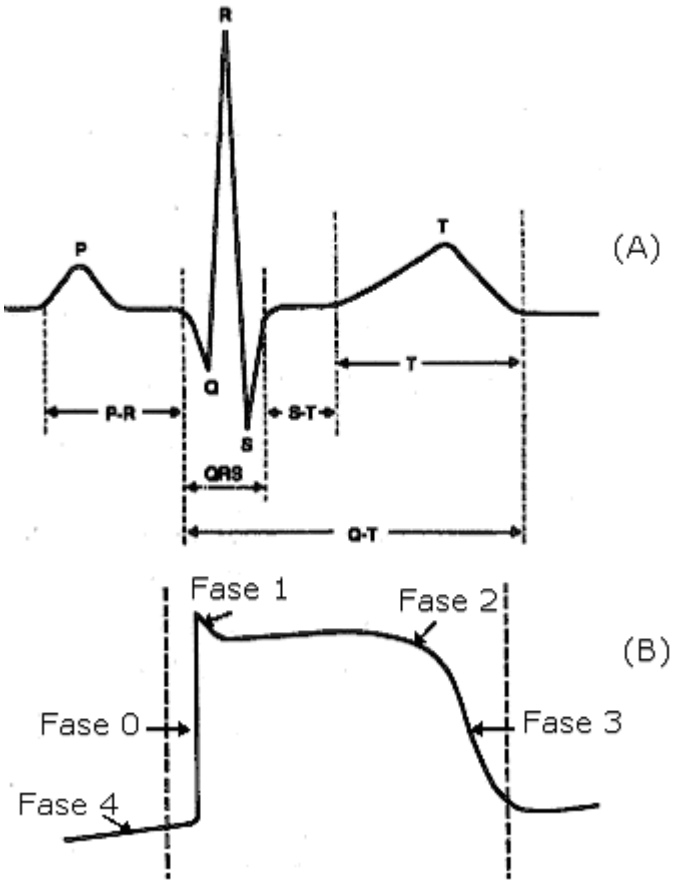


Figura 4: Registro de Eletrocardiograma normal com todos seus componentes e respectivas designações (A). Potencial de ação de uma célula miocárdica ventricular (B) registrado simultaneamente.

Fonte Adaptação de Tan *et al*., 1995.

2.9. Fármacos cardiotóxicos

O Comitê para Produtos de Propriedade Medicinal (CPMP) notificou várias substâncias

que não são agentes terapêuticos cardiovasculares, mas desencadeiam sérios eventos cardíacos através principalmente do prolongamento do intervalo QT. Esses agentes pertencem a diferentes classes farmacológicas como: fármacos psicotrópicos (antidepressivos tricíclicos e tetracíclicos, derivados fenotiazínicos, haloperidol, risperidona e pimozida), procinéticos (cisaprida), antimaláricos (halofantrine, quinidina e cloroquina), antibióticos (azitromicina, eritromicina, pentamidina, claritromicina e trimetropina-sulfametoxazole), antifúngicos (cetoconazol, fuconazol e itraconazol) entre outros. Acredita-se que há uma relação entre o prolongamento QT observado no ECG e risco de morte súbita, o que justificaria a necessidade de rigorosos testes clínicos para deteminar o risco de eventos cardíacos fatais por fármacos que têm propensão a prolongar QT (Crumb e Cavero, 1999).

O bloqueio direto de canais de K^+ do tipo hERG (human ether a-go-go related gene) é um dos mecanismos de ação de alguns fármacos que desencadeiam a chamada Síndrome adquirida de prolongamento QT (LQTS). Mais recentemente, um novo mecanismo tem sido relatado: o de inibição do tráfego de canais $hERG/_{IK}$ para a superfície da célula. Esse novo mecanismo tem sido atribuído ao trióxido de arsênio, pentamidina, probucol, fluoxetina e tártaro emético (Dennis, Wang *et al.*, 2007)

Viguer e cols (2006) apresentaram o caso de uma paciente que recebeu 20 mg Sb/kg/dia de antimoniato de meglumina VIM e obteve quadro de hipopotasssemia e *torsade de pointes*, sugerindo que os antimoniais devem ser incluídos entre os fármacos capazes de produzir *torsades de pointes* por ação direta sobre os canais iônicos do miócito ou por favorecer a depleção de potássio. Kuryshev e cols (2006) sugerem como mecanismo de ação o aumento nas correntes cardíacas de cálcio e não interferência nas correntes de K^+ mediadas via hERG/IK, pois, apenas 0,3 μM de tártaro emético foi suficiente para aumentar 50% das correntes de cálcio em miócitos ventriculares de cobaias.Os canais de cálcio regulam a fase platô do potencial de ação e um aumento na sua amplitude pode retardar a repolarização e prolongar o intervalo QT

Nesse contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar comparativamente a toxicidade de fármacos, similares ao antimoniato de meglumina comercial, sintetizados por pesquisadores brasileiros por diferentes rotas sintéticas com o fármaco comercial (Glucantime®), rotineiramente utilizado na terapia de leishmaniose no Brasil.

III.OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do antimoniato de meglumina obtido por três diferentes rotas sintéticas as quais originam diferente teores de SbIII residual: comercial (GLUC), $SbCl_5$ (AM) e $KSb(OH)_6$ (AM1) sobre fígado, pâncreas, coração e rins em ratos Wistar.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliação da toxicidade hepática e pancreática do GLUC, AM e AM1 através de:
    a. Dosagens séricas de transaminases (AST e ALT), fosfatase alcalina e amilase pancreática, além de análise histopatológica no tratamento por até 30 dias;
    b. Dosagens séricas de transaminases (AST e ALT), fosfatase alcalina e amilase pancreática, além de análise histopatológica após administração em dose única.

- Avaliação da toxicidade renal do GLUC, AM e AM1 através de:
    a. Dosagens urinárias de sódio, potássio e proteínas, depuração de creatinina, além de análise histopatológica no tratamento por até 30 dias;
    b. Análise histopatológica após administração em dose única.

- Avaliação da toxicidade cardiovascular do GLUC, AM e AM1:
    a. Doseamento da creatino quinase fração MB (CKMB) sérica, avaliação de sinais de ECG e PA, além de análise histopatológica do coração, no tratamento por até 30 dias;
    b. Avaliação de sinais de ECG, doseamento de CKMB sérica e análise histológica após administração em dose única.

- Doseamento sérico do teor total de antimônio após administração por 30 dias de GLUC, AM e AM1.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fármacos

- Antimoniato de N-metilglumina Comercial (Glucantime® - GLUC) lote 206855
- Antimoniato de meglumina cuja fonte de Sb(V) seja $SbCl_5$ (AM) *
- Antimoniato de meglumina cuja fonte de Sb(V) seja $KSb(OH)_6$ (AM1)*
- Como solução controle foi administrada solução salina tamponada (tampão PBS pH 7,2)

*Cedidos pelos cols Fréderic Frézard e Cynthia Demicheli e sintetizados segundo Demicheli *et al*, 2003 no Departamento de Química da UFMG.

4.2. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em equipamento Airone 200, com exceção da proteinúria, que foi analisada em espectrofotômetro CELM E2250. Todas as análises foram executadas no Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da UFOP (LAPAC).

- Amilase (Bioclin®): metodologia cinética. A alfa-amilase catalisa a hidrólise do 2-cloro-4-nitrofenilmaltriosídeo (CP-G3) liberando 2-cloro-4-nitrofenol (CNP), 2- cloro-4- nitrofenil-maltosídeo (CNP-2), maltotrose (G3) e glicose (G). A concentração catalítica é determinada a partir a velocidade de formação do 2-cloro-4-nitrofenol, medido a 405 nm.

CNPG3→ Alfa-amilase→CNP + CNPG2 +G3 +G

- Creatinina (Bioclin®): metodologia cinética colorimétrica Jaffé modificado. A creatinina reage com o ácido pícrico obtendo-se um cromógeno de cor amarelo-avermelhado. Nesse pH ocorre a máxima formação do complexo creatinina-picrato e também complexos com outros elementos plasmáticos. Com a adição do reagente ácido, o pH é diminuído e a cor devida à creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromógenos. Por diferença entre as leituras obtidas em diferentes pHs, obtêm-se o valor real da creatinina.

- Proteinúria (Micropote Doles®): metodologia colorimétrica. O coomassie azul brilhante forma um complexo corado com albumina e diferentes variedades de globulinas, reagindo

integralmente com todas as proteínas existentes na urina ou líquor. A leitura é medida a 610nm.

- AST / TGO (Bioclin®): metodologia cinética (UV). A aspartato aminotransferase (AST) catalisa a transferência de grupos amina do aspartato para o α-cetoglutarato, levando à formação de glutamato e oxaloacetato. O oxaloacetato em presença de malato desidrogenase (MDH) reage com o nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), reduzindo-se a malato e o NADH oxida-se a NAD^+. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da AST na amostra.

$$\text{L-Aspartato} + \alpha\text{-Cetoglutarato} \xrightarrow{\text{AST}} \text{Oxaloacetato} + \text{L-Glutamato}$$

$$\text{Oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{L-Malato} + \text{NAD}^+$$

- ALT /.TGP (Bioclin®): metodologia cinética (UV). A aspartato alaninatransferase (ALT) catalisa a transferência de grupamento amina da alanina para o α-cetoglutarato, levando à formação de piruvato e glutamato. O piruvato em presença de LDH, reage com o NADH, reduzindo-se a lactato e o NADH oxida-se a NAD^+. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da ALT na amostra.

$$\text{L-Alanina} + \alpha\text{-Cetoglutarato} \xrightarrow{\text{AST}} \text{Piruvato} + \text{L-Glutamato}$$

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-Lactato} + \text{NAD}^+$$

- Fosfatase Alcalina (Bioclin®): metodologia cinética. A fosfatase alcalina (ALP) hidroliza o p-nitrofenilfosfosfato (p-NFF), que é incolor, poduzindo fosfato p-nitrofenol em pH 9,0. A velocidade de formação do ânion p- nitrofenilato (amarelo) a 405 nm, é proporcional à atividade enzimática da amostra. A dietanolamina (DEA), além de regular o pH da reação, intervém ativamente na mesma, atuando como receptor de fosfato liberado pela enzima.

p-NFF + Amino- álcool-ALP → p-Nitro fenol + Amino- alquil fosfato

- CKMB (Bioclin®): metodologia cinética. O processo envolve a medida da atividade de creatina quinase (CK) na presença de um anticorpo contra a fração M. Este anticorpo inibe completamente a atividade do CKMM e a fração M do CKMB, sem entretanto afetar a atividade da subunidade B do CK-B do CKMB e do CKBB. Desta forma apenas a atividade de CKMB é determinada pela dosagem de CK. A atividade de CKMB é então obtida multiplicando a atividade de CKB por dois.

Creatina fosfato + ADP (CK) → creatina + ATP

ATP + glicose-hexoquinase (HK) → glicose-6-fosfato +ADP

Glicose-6-fosfato + NADP + (G-6PDH) → gluconolactona-6-fosfato + NADPH + H^+

A velocidade de redução de NADP + a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) é proporcional à atividade de CK da amostra

- Sódio e Potássio urinários (Motta, 2003): A determinação de sódio e potássio utilizando fotômetro de chama (Micronal B 462) consiste na atomização da amostra produzindo átomos em estado excitado capazes de emitir luz em comprimento de onda específico: sódio emite luz de coloração amarela e potássio de coloração violeta. A intensidade de energia emitida é proporcional ao teor destes elementos na amostra. O padrão para doseamento consistiu na solução padrão para fotômetro de chama com concentração de sódio de 140 mmol/L e potássio 5 mmol/L (FC180-CELM-lote 610617).

4.3. Doseamento de SbIII residual

O doseamento de SbIII foi realizado por espectrofotometria de absorção no visível com leitura a 560 nm de acordo com Frezard *et al.*, 2001. A metodologia da análise é baseada na interação específica de SbIII e cromóforo vermelho de bromopirogalol (BPR). As análises foram realizadas no Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

4.4. Doseamento de Potássio residual

Os fármacos AM e AM1 foram solubilizados em solução salina tamponada e submetidos à análise através de fotômetro de chama (Micronal B 462) na concentração final de 300 g antimoniato de meglumina/L. Esta metodologia consiste na atomização da amostra produzindo átomos em estado excitado capazes de emitir luz em comprimento de onda específico: potássio emite luz de coloração violeta. A intensidade de cada cor emitida é proporcional ao teor deste elemento na amostra. O padrão para doseamento consistiu na solução padrão para fotômetro de chama com concentração de potássio 5 mmol/L (FC180-CELM-lote 610617).

4.5. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando 150 a 250 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e pelo biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério da Escola de Farmácia da UFOP até sua utilização, sob ciclo de 12 horas claro/escuro e recebendo água e ração (Socil®) *ad libitum.*

4.6. Procedimento cirúrgico para a avaliação cardiovascular

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/kg) por via intraperitoneal (VIP). Após a anestesia ter alcançado a profundidade adequada, os animais foram traqueostomizados utilizando-se uma cânula de polietileno para possibilitar respiração adequada e foi introduzido o catéter intravenoso para administração dos fármacos nos experimentos de dose única e catéter intra-arterial para aquisição de sinais de PA no experimento subagudo. A implantação foi realizada após tricotomia, assepsia e incisão da região inguinal para exposição de artéria e veia femoral. A artéria foi ocluída com auxílio de uma linha de algodão e, após incisão, foi inserida a extremidade PE 10 do catéter, ficando este localizado na aorta abdominal, abaixo das artérias renais para aquisição de sinais de pressão arterial.

4.7. Aquisição e análise dos sinais de eletrocardiograma e pressão arterial

Agulhas hipodérmicas de aço inoxidável foram utilizadas como sensores para obtenção de sinais do eletrocardiograma (ECG). As agulhas foram inseridas subcutaneamente nos membros superior direito e inferior esquerdo para aquisição da diferença de potencial relativa à derivação DII.

Para aquisição dos sinais de pressão arterial (PA) foi utilizado transdutor de pressão modelo P23XL (spectramed, EUA) conectado ao catéter. Os sensores de ECG e transdutor de PA foram acoplados a um sistema condicionador de sinais que fornecia sinais em tempo real em uma freqüência de 1200 Hz processados por uma placa conversora analógico-digital Windaq Board (modelo DI 200 EUA). A Figura 5 ilustra o sistema utilizado para aquisição de sinais referidos.

Os sinais obtidos foram analisados posteriormente com o auxílio do software Windaq,

extraindo-se os seguintes parâmetros de ECG e PA: intervalo PR, intervalo QRS, intervalo QT, intervalo QTc, PAS,PAD e FC.

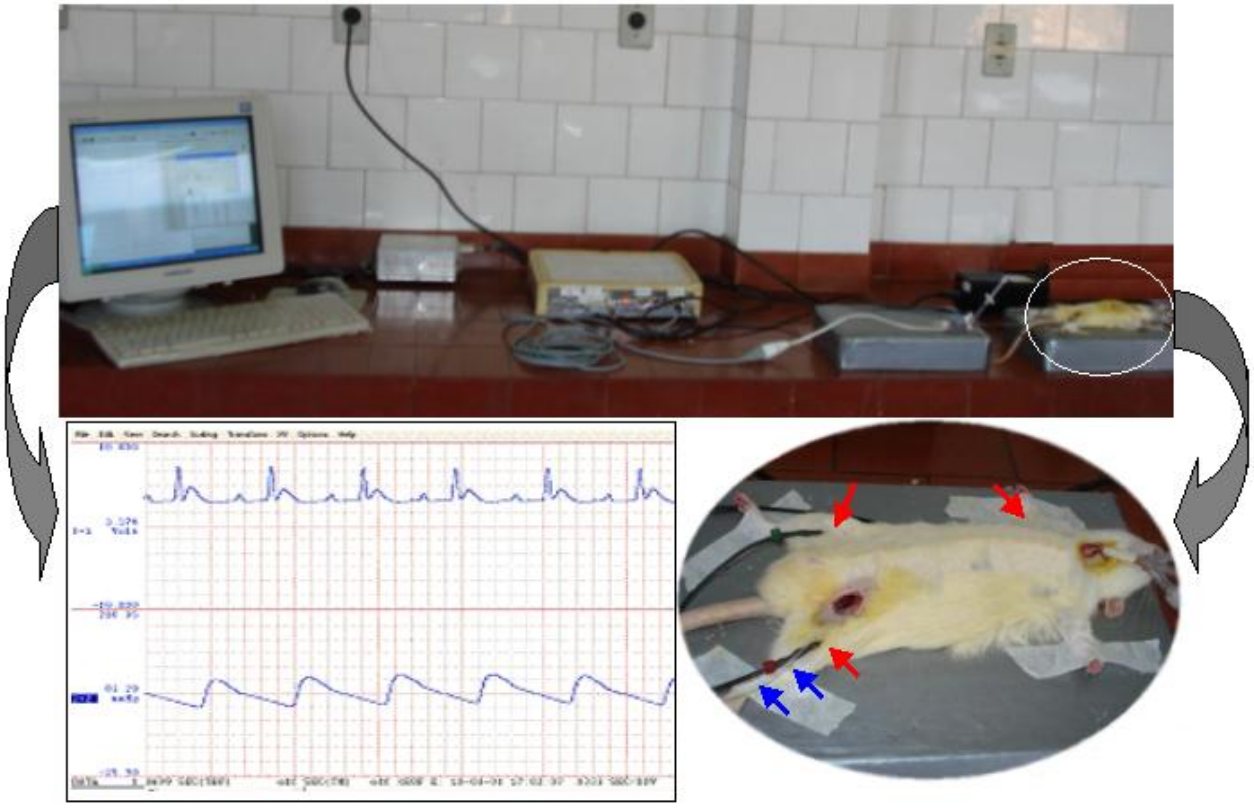


Figura 5: Sistema de aquisição de sinais de eletrocardiograma e pressão arterial. Em destaque, lado direito da figura: animal anestesiado após cirurgia com agulhas hipodérmicas inseridas subcutaneamente (setas vermelhas) e cateteres inseridos intravenoso* ou intra-arterialmente para administração do fármaco e aquisição de pressão arterial, respectivamente (setas azuis). No lado esquerdo, em destaque o sinal obtido pelo sistema.* apenas para o protocolo em dose única

4.8. Protocolos Experimentais

A. Administração sub-aguda

Os animais foram divididos em 4 grupos que receberam por via intraperitoneal (VIP) por 3, 7, 15 ou 30 dias de tratamento (n=8/grupo/tempo): CONT: Grupo controle - solução salina tamponada; AM: 50 mg Sb/kg/dia; AM1: 50 mg Sb/kg/dia; GLUC: 50 mg Sb/kg/dia. Os fármacos AM e AM1 foram solubilizados em solução salina tamponada (pH 7,2) na concentração de 69 mg/ml e as soluções foram mantidas sob agitação e aquecimento a temperatura em torno de 50ºC até ficarem límpida e transparente. O medicamento comercial

(GLUC) foi adquirido na forma de ampolas, contendo 425 mg de Sb/5ml, para administração parenteral. Após a última administração, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina durante o período de 24 horas, no qual os animais foram submetidos ao jejum alimentar e hídrico. A urina foi utilizada para doseamento de potássio e sódio. Após o período de 24 horas foram obtidos os sinais de ECG e PA. Em seguida o sangue foi coletado pela carótida para as análises bioquímicas e doseamento de Sb, e os órgãos foram retirados para posterior análise histológica. A figura abaixo ilustra o protocolo descrito:

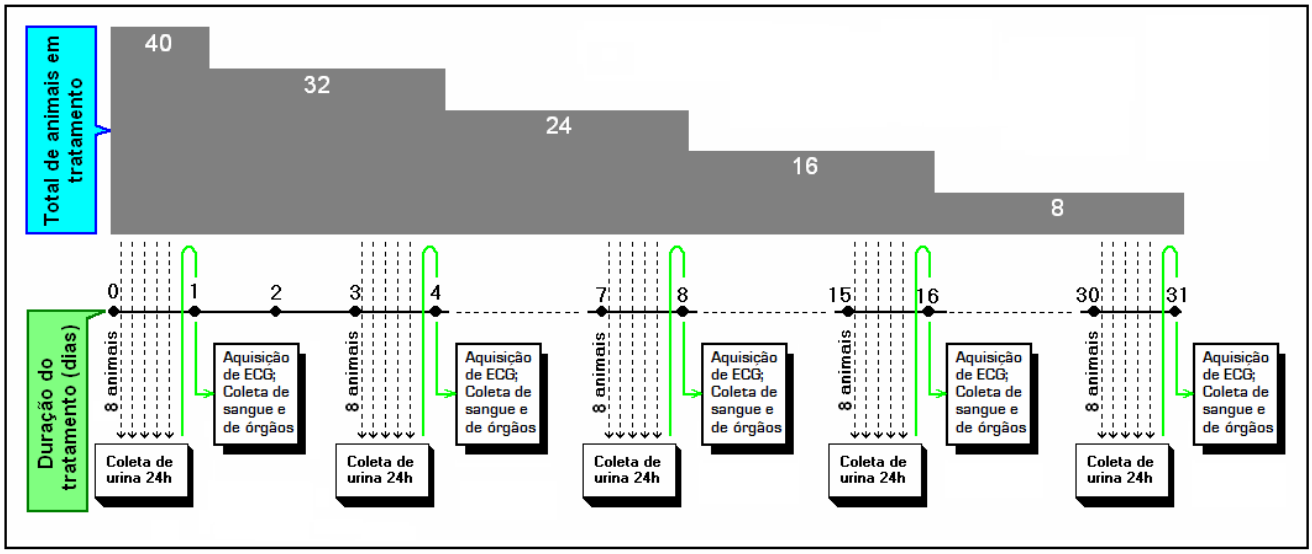


Figura 6: Protocolo das atividades desenvolvidas no tratamento sub-agudo (n=8/grupo)

B. Administração aguda em dose única

Após o procedimento cirúrgico, foi obtido sinal de ECG por 5 minutos como registro controle. Em seguida os animais foram divididos em 4 grupos que receberam por via endovenosa (VIV) e em injeção lenta (n=8/grupo): CONT: Grupo controle - solução salina tamponada; ou uma dose dez vezes maior que a utilizada no protocolo sub-agudo, ou seja, 500 mg Sb/kg contido em AM, AM1 ou GLUC.

A Figura 7 abaixo ilustra as atividades realizadas no protocolo de tratamento em dose única:

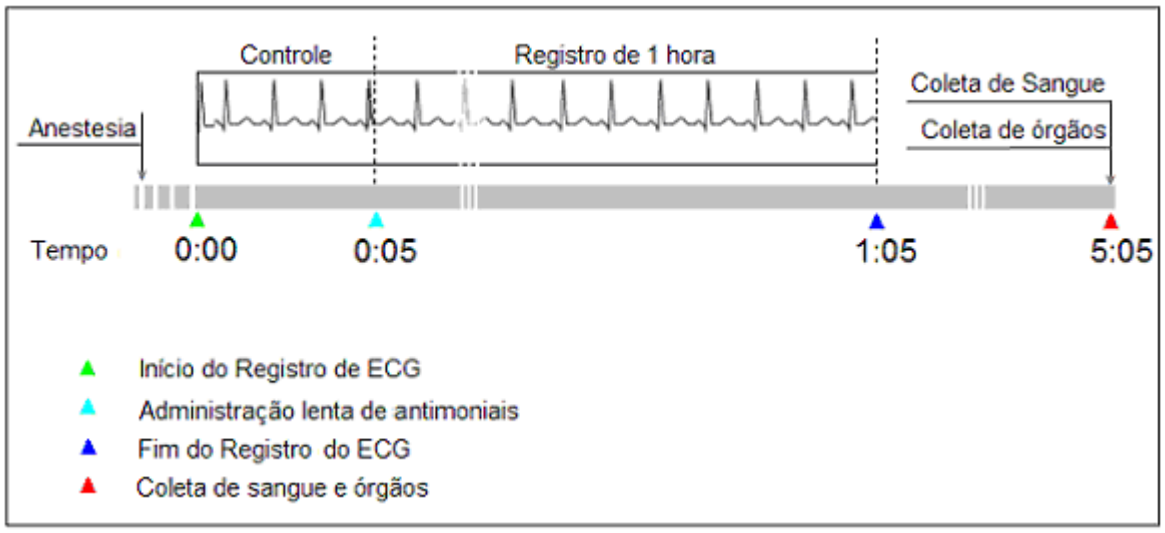


Figura 7: Protocolo de atividades desenvolvidas com tratamento agudo em dose única de 500 mg Sb/kg administrados endovenosamente por injeção lenta (n=8/grupo)

OBS: Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto (n^{o}2007/99).

4.9.Análise histológica dos órgãos

Após o registro de ECG e coleta de sangue pela carótida, procedeu-se à necropsia dos animais, na qual os órgãos: coração, pâncreas, fígado e rins foram coletados com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica. Os referidos órgãos foram então fixados em solução de formol 10% tamponado até o processamento em equipamento histotécnico (OMA CM69). Para o referido processamento os órgãos foram seccionados para obtenção de dois fragmentos os quais foram desidratados em concentrações crescentes de alcoóis (70%, 80%, 90% e três trocas de álcool absoluto) e diafanizados em duas trocas de xilol (substituindo álcool por xilol tornando os tecidos transparentes e prontos para receber a parafina). Em seguida, os cortes dos tecidos foram incluídos em parafina e submetidos a microtomia (micrótomo American Optical 820), obtendo-se fragmentos com espessura de 4 µm, os quais foram fixados sobre as lâminas de vidro e submetidos a secagem em estufa. As lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina (HE) e levados novamente à estufa para secagem, e então, foram montadas com entellan (Merck®) e lamínula e, finalmente, submetidas à secagem à temperatura ambiente por 72 horas para posterior análise (Beçak e Paulete, 1976; Behumer *et al*., 1976). Os cortes foram avaliados em microscópio (Olympus CH 30) por dois observadores, sendo determinadas alterações degenerativas, inflamatórias, hiperêmicas e sendo estas classificadas em ausente (-), discretas

(+), moderadas (++) ou acentuadas (+++). Todas as atividades foram realizadas no laboratório de Imunopatologia da UFOP de acordo com as normas deste laboratório.

A Figura 8 ilustra as etapas para obtenção das lâminas:

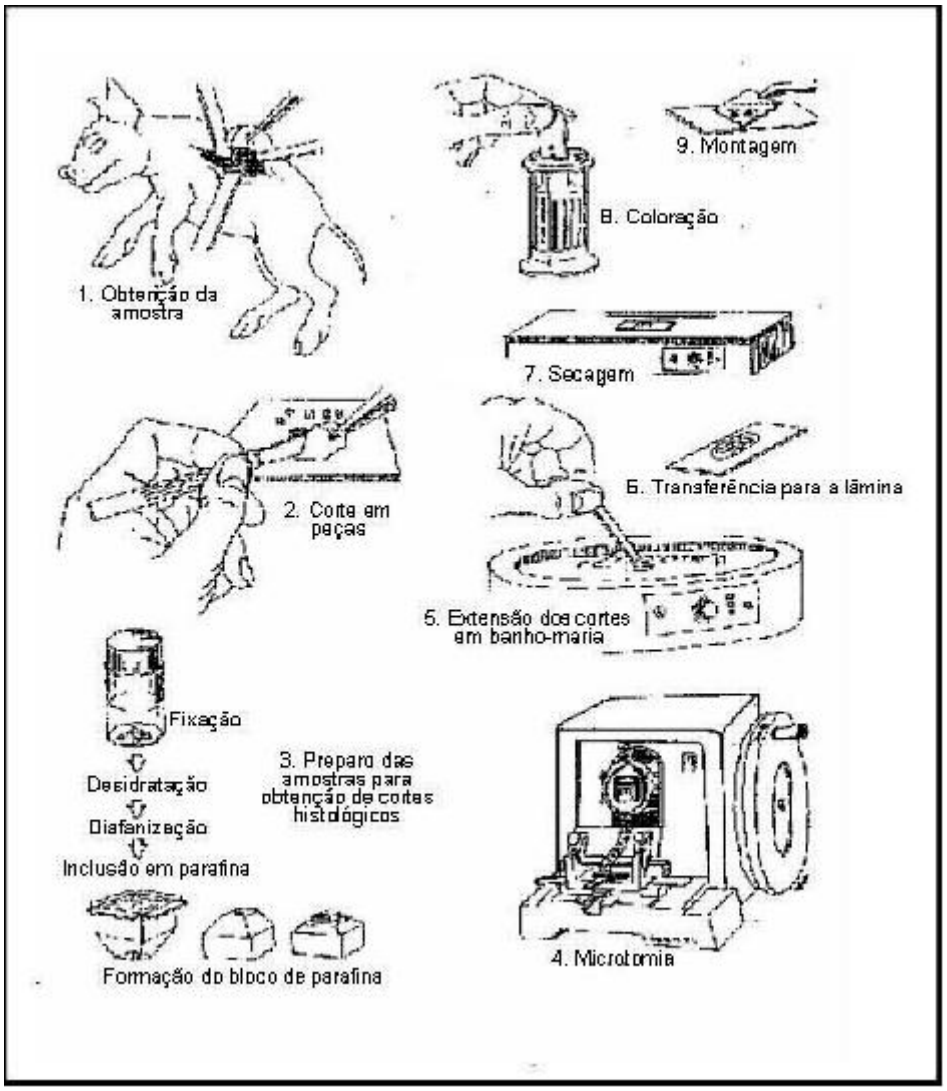


Figura 8: Protocolo de atividades desenvolvidas na etapa de análise histológica

4.10. Doseamento de antimônio total

O doseamento de Sb total nas amostras de soro obtidas após administração VIP dos compostos antimoniais ou solução salina tamponada no protocolo sub-agudo, foi realizado de acordo com Costantini e cols (1985) por espectrometria de absorção atômica acoplado a forno

de grafite em espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer Modelo Analyst 600 do Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

4.11. Análise Estatística

Os resultados bioquímicos obtidos foram avaliados através do software R e, por não terem passado no teste de normalidade, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Bonferroni, também com auxílio do software R. Já os parâmetros do ECG e de pressão arterial por atenderem ao quesito de normalidade, foram analisados por One-way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. Já os dados de concentração residual de Sb sérico foram analisados por Two-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni O software GraphPad Prisma 4.0 foi utilizado como ferramenta para às análises de variância..Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

V-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Doseamento de Sb III residual

Tabela 2: Teor de SbIII residual nos compostos antimoniais

Composição	**Composto Antimonial (abreviação)**	**% de Sb III residual (p/p)***
Antimoniato de Meglumina Comercial (lote 206855)	GLUC	$0,12 \pm 5,7x10^{-4}$
Antimoniato de Meglumina de $SbCl_5$	AM	$0,20 \pm 1,7x10^{-8}$
Antimoniato de Meglumina de $KSb(OH)_6$	AM1	$0,0011 \pm 5,7x10^{-5}$

* em relação ao Sb total estimado na amostra em mol/L

No Brasil, casos de leishmaniose têm aumentado e o tratamento é a grande arma de combate devido à complexidade de sua epidemiologia (Lima, Porto *et al.*, 2007).

As marcas vendidas para uso clínico normalmente apresentam apenas a quantidade total de Sb contido na formulação, mas encontram-se porções diferentes de SbIII em marcas distintas de antimoniato de meglumina, sugerindo cuidados no controle de qualidade dos lotes desses produtos uma vez que compostos antimoniais trivalentes são tóxicos tanto para células dos parasitos quanto para as humanas (Dzamitika, Falcao *et al.*, 2006)relatam a importância da especiação do antimônio no fármaco, visto que o efeito terapêutico versus toxicidade parece estar intimamente relacionado com o estado de oxidação do elemento.

Além disso, a quantidade de Sb em diferentes lotes pode ser, algumas vezes, maior que a quantidade relatada pelos fabricantes e tal fato pode contribuir com efeitos colaterais mais graves o que determina a importância do doseamento de Sb nas formulações (Delgado, Macias *et al.*, 1999).

Neste contexto, e visando uma posterior possível correlação com os resultados de toxicidade, avaliamos o teor de SbIII residual nos fármacos estudados: AM, AM1 e GLUC, nos quais foram encontrados, respectivamente, valores de 0,2%; 0,011% e 0,12% em relação ao Sb total (Tabela 2). Tais resultados estão de acordo com valores anteriormente relatados por

Frézard e cols (2001) e Dzamitika e cols (2006), utilizando a mesma metodologia.

Dzamitika e cols (2006), neste mesmo trabalho, sugeriram que o SbIII residual determina toxicidade contra células mamíferas, logo, o processo de obtenção de AM1, com menor quantidade de Sb III residual parece ser mais promissor que o utilizado para obter AM.

5.2.Doseamento de Potássio residual

Além do doseamento de Sb III residual, consideramos também importante a realização do doseamento de potássio, visando avaliar se o referido teor deste íon nos fármacos poderia influenciar a toxicidade dos compostos antimoniais pentavalentes estudados.

Foram identificados, elevados teores de potássio residual nos três fármacos: AM, AM1 e GLUC como apresentado na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3: Concentração de potássio (mmol/L) das soluções de antimoniato de meglumina 300g/L

Amostras	**Fármacos**		
	AM	**AM1**	**Glucantime**
Concentração de potássio (mmol/L)	39,0	113,0	10,2

A formulação comercial apresentou menor teor desse íon, mas ainda representa uma quantidade importante de potássio, superior aos valores encontrados no soro que é cerca de 4,5 mmol/L para humanos (Gaw, Cowan *et al.*, 2001)

5.3. Avaliação da toxicidade pancreática

A. Protocolo sub-agudo por até 30 dias

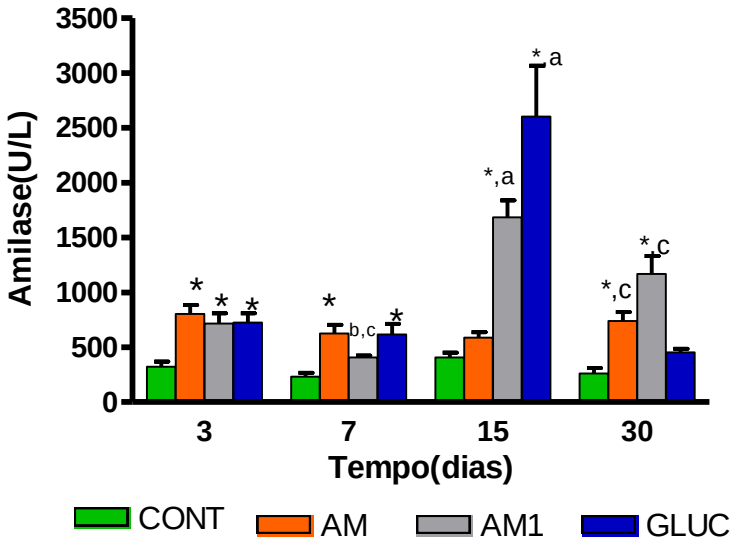


Figura 9: Valores séricos de amilase após administração VIP. dos fármacos ou salina (n=8/grupo) por 3, 7, 15 ou 30 dias.* diferença significativa entre os grupos que receberam antimoniais pentavalentes e salina tamponada a- diferença comparada ao grupo que recebeu AM b- diferença comparada ao grupo que recebe AM1 c-diferença comparada ao grupo que recebeu GLUC ($p<0.05$)

Como pode ser observado na Figura 9 e Tabela 11 (anexo), foram identificadas diferenças significativas nos teores de amilase, em relação ao grupo controle salina para os tempos 3, 7, 15 e 30 dias (354,8; 232,8; 378,0 e 210,6 U/L respectivamente) em todos os tempos de análise. AM induziu aumento deste teor já na administração por três dias (700,7 U/L), no entanto os níveis não aumentaram com o tempo de tratamento, o qual se manteve relativamente estável nos tempos 7, 15 e 30 dias (559,5; 547,9 e 671,0 U/L respectivamente). Para o grupo AM1 a elevação em relação ao grupo salina, também foi identificada desde o tempo de 3 dias (629,2 U/L), porém esta elevação é significativamente maior em 15 (1685,0 U/L) e 30 dias (1167,0 U/L). Já para o grupo GLUC, também houve elevação amilásica nos primeiros tempos avaliados 3 (726,1 U/L) e 7 dias (521,9 U/L), o qual se eleva amplamente após tratamento por 15 dias (2208,0 U/L) retornando, no entanto, a níveis séricos semelhantes ao grupo controle após tratamento por 30 dias (452,2 U/L).

A elevação encontrada nos valores de amilase neste trabalho parece estar associada ao acúmulo de Sb pentavalente durante o tratamento, como proposto pelo Ministério da Saúde (2006), pois ocorre com o maior número de doses para AM1 e GLUC, e não devido ao maior

teor residual de SbIII do AM. O efeito do antimoniato de meglumina parece ser dose e tempo dependentes e mesmo maior parte do Sb sendo eliminada rapidamente, parte da concentração aumenta gradualmente depois de repetidas doses (Berman, 1988; Chulay, Fleckenstein *et al.*, 1988; Davidson, 1998)o que leva a acúmulo do fármaco no tratamento em longo prazo (Chulay, Fleckenstein *et al.*, 1988).

(Delgado, Macias *et al.*, 1999), ao realizar estudo com pacientes HIV positivos e com LV, identificaram o aparecimento de amilasemia assintomática, em humanos com concentração sérica acima de 200U/L ou elevação de 200 U/L acima do valor basal. Já Motta (2003) descreve que nem sempre a magnitude da elevação dos níveis de amilase se correlaciona com a severidade do envolvimento pancreático na pancreatite aguda.

B. Protocolo agudo em Dose Única

Os resultados obtidos para o parâmetro bioquímico amilase após administração lenta de 500 mg Sb/kg VIV, em dose única, encontram-se apresentados na Figura 10 e Tabela 10 (anexo) Através da análise da referida figura pode ser identificada diferença significativa nos teores de amilase após administração do Glucantime® (891,8 U/L) tanto em relação ao grupo controle (572,4 U/L), quanto ao grupo que recebeu AM (577,7 U/L). Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas nos teores de amilase após administração de AM e AM1 em dose única. Tendo em vista a possibilidade de maior polimerização de AM e AM1 em relação ao GLUC (Dzamitika *et al.*, 2006; Sundar *et al.*, 1998), pode ser pensado que, neste protocolo agudo de dose única (DU), o GLUC por disponibilizar mais facilmente o Sb total para o organismo, induziria elevação dos níveis de amilase o que não foi observado com AM e AM1.

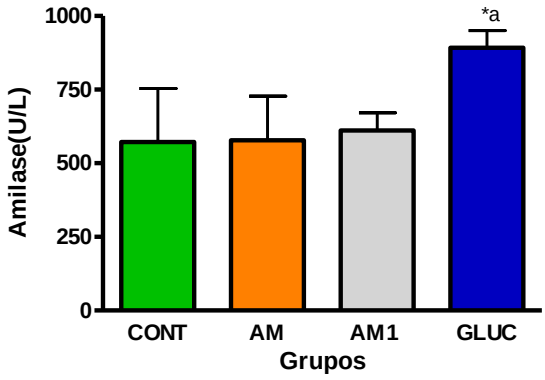


Figura 10: Valores séricos de amilase após administração lenta VIV. dos fármacos ou salina (n=8/grupo) * diferença significativa entre os grupos que receberam antimoniais pentavalentes e salina tamponada a-diferença comparada ao grupo que recebeu AM ($p<0.05$)

C. Análise Histológica

A análise microscópica do pâncreas, corado por HE, após administração por até 30 dias de AM AM1 e GLUC, não apresentou alterações celulares relevantes quando comparadas ao grupo controle salina. Por outro lado, leve congestão no tecido pancreático foi observada após administração de dose única de 500 mg/kg de AM1 e GLUC em relação ao grupo salina, o que não ocorreu com o grupo tratado com AM.

Ao avaliarmos conjuntamente as alterações dos teores de amilase induzidas pelos tratamentos sub-agudo e agudo dos três fármacos estudados, bem como a análise histológica, pode ser observado que, apesar do AM, AM1 e GLUC induzirem alterações no teor de amilase, microscopicamente, pequena congestão celular pode ser identificada apenas no tratamento agudo. Estes resultados indicam a ocorrência de leve toxicidade pancreática induzida pelas condições experimentais empregadas, a qual provavelmente seria reversível com a suspensão do tratamento, uma vez não ter sido observado comprometimento do tecido pancreático.

No tratamento com antimoniais em humanos, em um estudo com 65 pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa que receberam 20 mg Sb/kg de SbV uma vez ao dia VIV, foi observado que 65% dos pacientes apresentaram concentrações séricas de amilase maiores que o limite superior normal porém, o tratamento não foi interrompido pois tais alterações não foram clinicamente significativas a ponto de mudança na terapia por si só, na ausência de outros indicadores de pancreatite (Lawn, Armstrong *et al.*, 2006)

5.4. Avaliação da toxicidade hepática

A. Protocolo sub-agudo por até 30 dias

A AST e a ALT são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades nos hepatócitos. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST está presente nas mitocôndrias. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação. Em dano hepatocelular leve, a forma predominante no soro é a citoplasmática, e em lesões graves, há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (Motta, 2003).

A ALT é utilizada para diagnóstico das enfermidades hepatobiliares agudas, já a AST

eleva-se em casos de necrose cardíaca. O predomínio da ALT indica somente uma alteração na membrana, enquanto o predomínio da AST revela lesão das organelas citoplasmáticas (Alarcón-Corredor *et al*, 2000).

A fosfatase alcalina localiza-se nas membranas de revestimento dos canalículos biliares, assim, a enzima encontra-se elevada em desordens do trato biliar, nas hepatites virais e cirrose e pode também elevar-se em resposta a alguns fármacos e insuficiência renal crônica (Motta, 2003).

A Figura 11 a seguir ilustra os valores séricos de AST e ALT e fosfatase alcalina encontrados na administração sub-aguda por até 30 dias com os fármacos AM, AM1 e GLUC.

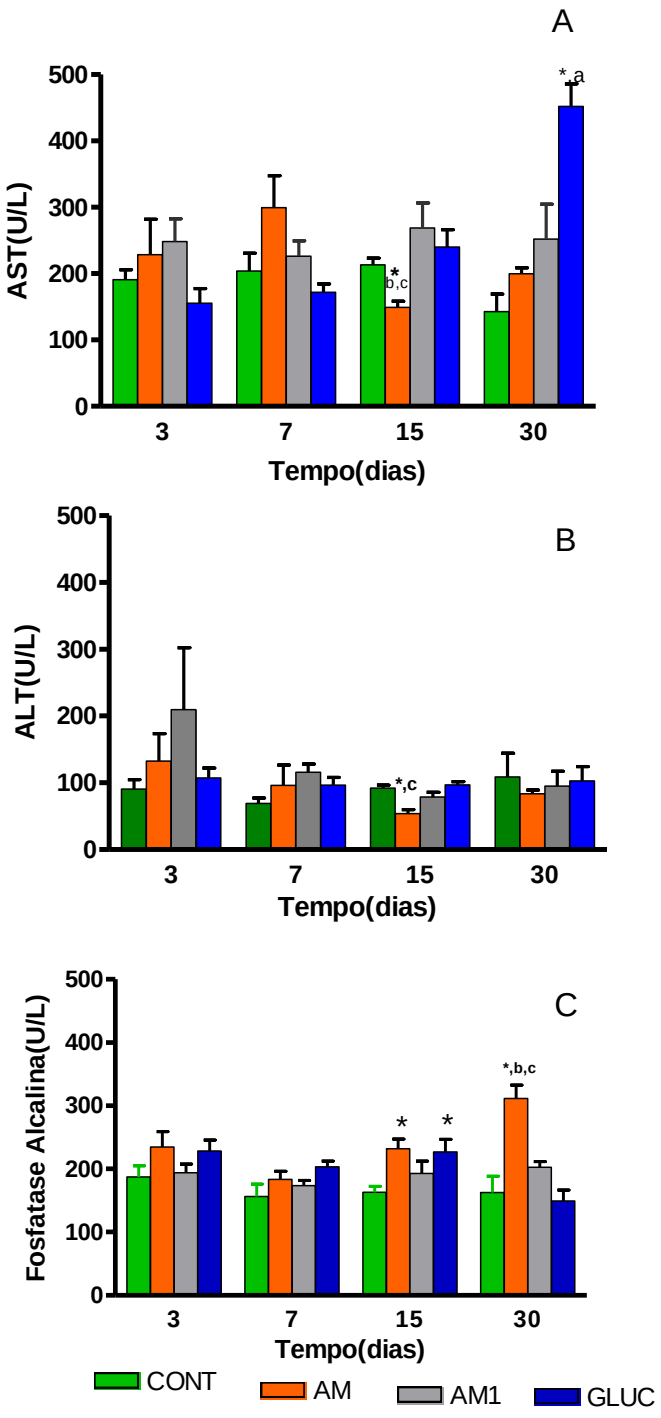


Figura 11: Valores séricos de (A): AST ; (B): ALT e (C) fosfatase alcalina após administração i.p. dos fármacos ou salina (n=8/grupo) por 3, 7, 15 ou 30 dias * diferença significativa entre os grupos que receberam antimoniais pentavalentes e salina tamponada a- diferença comparada ao grupo que recebeu AM b- diferença comparada ao grupo que recebe AM1 c-diferença comparada ao grupo que recebeu GLUC ($p<0.05$)

Para o parâmetro AST e ALT, nos tempos 3 e 7 e 15 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos que receberam antimoniais e o grupo controle, exceto por pequena, porém significativa, redução do teor induzido por AM no tempo 15 dias (AST 149,5 U/L e ALT 53,8 U/L) em relação ao controle (AST 213,6 U/L e ALT 96,1 U/L). Já no tempo 30 dias pode ser observado que AM, AM1 e GLUC, induziram alterações crescentes no teor de AST, no entanto, apenas o grupo tratado com GLUC (423,2 U/L) apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (155,7 U/L) (Figura 11 A e B e Tabelas 12 e 13- anexo).

Já para fosfatase alcalina (Figura 11 C e Tabela 14- anexo) também não foram encontradas diferenças significativas nos tempos 3 e 7 dias. No entanto, após tratamento por 15 dias com AM (231,8 U/L) e GLUC (227,1 U/L), diferenças significativas foram identificadas em relação ao grupo controle (163,3 U/L), a qual manteve-se significativa apenas para o grupo AM decorridos 30 dias de tratamento (260,0 U/L) também em relação ao grupo controle (183,2 U/L). O GLUC parece retornar a um equilíbrio quanto ao teor sérico de fosfatase alcalina, mostrado através da diminuição do mesmo no tempo 30 dias (149,3 U/L). Como AM e GLUC apresentam maiores valores residuais de SbIII (0,2 e 0,12 µg/mL, respectivamente), provavelmente esta alteração pode ser atribuída à atuação hepatotóxica da forma trivalente como proposto por Dzamitika e cols (2006).

B. Protocolo agudo em Dose Única

Os resultados obtidos para os parâmetros bioquímicos AST, ALT e fosfatase alcalina após administração lenta de 500 mg Sb/kg VIV, em dose única, encontram-se apresentados na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4: Valores séricos de AST, ALT e fosfatase alcalina após administração de 500 mg Sb/kg/dia VIV contido nos fármacos (n=8/grupo)

Grupo	AST	ALT	Fosfatase Alcalina
	X ± e.p.m	X ± e.p.m	X ± e.p.m
CONT	331,9 ± 32,15	248,1 ± 42,69	544,4 ± 39,66
AM	265,8 ± 30,77	483,8 ± 125,00	539,1 ± 75,45
AM 1	338,1 ± 70,92	395,7 ± 82,15	593,0 ± 30,55
GLUC	356,3 ± 38,55	198,8 ± 27,60	593,2 ± 60,67

* $p<0.05$ comparados com os animais do grupo controle que receberam administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni)

Não foram encontradas diferenças significativas nos teores das transaminases e fosfatase alcalina após administração de AM, AM1 ou GLUC, sugerindo a necessidade de doses cumulativas para aparecimento de alterações neste parâmetro, como observado para o tratamento sub-agudo.

C. Análise Histológica

As análises microscópicas dos fígados, corados por HE, após administração por até 30 dias de AM AM1 e GLUC, não induziram alterações celulares relevantes quando comparadas ao grupo controle salina. Já o protocolo agudo de DU com dose de 500 mg/kg induziu o aparecimento de pequena congestão celular no tecido hepático, o que pode traduzir leve toxicidade hepática.

Ao serem avaliados conjuntamente as alterações de transaminases e fosfatase alcalina induzidas na administração pelos fármacos AM, AM1 e GLUC nos protocolos sub-agudo e agudo associado á análise histológica, mostraram-se relevantes a elevação sérica de AST induzida pelo tratamento com GLUC por 30 dias, bem como de fosfatase alcalina induzida pelo tratamento por 15 e 30 dias com AM, possíveis indicativos de toxicidade subaguda induzida pelos tratamentos com estes fármacos. Por outro lado, não foram observadas microscopicamente alterações significativas, através da análise histológica em ambos os protocolos de tratamento sub-agudo e agudo, além da manutenção de teores normais nos parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática com o tratamento agudo de DU dos três fármacos estudados.

Apenas se observou leve congestão celular na análise histológica deste mesmo tratamento agudo; o que nos leva a avaliar como relativamente seguros quanto à hepatotoxicidade a utilização destes fármacos nas condições empregadas neste trabalho.

Em humanos, alguns trabalhos apresentam indicação de leve hepatotoxicidade os quais, no entanto, não inviabilizaram o tratamento com SbV. Em estudo com 65 pacientes com LC e LM que receberam 20 mg Sb/kg de SbV uma vez ao dia VIV, foi observado que em 85% dos casos as concentrações séricas de ALT e AST encontravam-se maiores que o limite superior normal, porém não houve interrupção do tratamento uma vez que tais alterações foram encontradas na maioria dos pacientes, não sendo clinicamente significativas e sem outros indicadores de hepatite (Lawn, Armstrong *et al.*, 2006). Além deste, estudo com 29 peruanos com LM tratados com de estibogluconato de sódio por 28 dias (20 mg SbV/kg/dia), também induziu aumento de até 3 vezes o limite superior de AST, porém esses níveis caíram no decorrer da terapia (Franke *et al* 1990; Berman 1997).

5.5. Avaliação da toxicidade renal

A. Protocolo sub-agudo por até 30 dias

A depuração (clearance) renal, teste que avalia a filtração glomerular (FG), é a medida da velocidade de remoção de uma substância do sangue durante a passagem pelos rins. A diminuição da depuração da creatinina é um indicador da redução de taxa de filtração glomerular, o que ocorre em enfermidades agudas ou crônicas do glomérulo ou de alguns dos seus componentes. A redução do fluxo sanguíneo glomerular diminui a depuração da creatinina e fenômeno semelhante pode ocorrer na lesão tubular aguda (Motta, 2003).

A FG é calculada por: FG = (U x V) /P onde U= concentração de creatinina na urina, P= concentração da creatinina no soro ou plasma e V= fluxo da urina em mL/min coletado em 24 horas. Quando a creatinina do soro se encontra anormal, as mudanças da concentração refletem mudanças na FG. Porém a concentração de creatinina no soro é um índice insensível da função renal, pois ela pode não se elevar até que a FG tenha caído 50% do normal (Graw, 2001).

Tabela 5 Valores de clearance de creatinina (não ajustado) nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m	Tempo 7 X ± e.p.m	Tempo 15 X ± e.p.m	Tempo 30 X ± e.p.m
CONT	0,5 ± 0,07	0,4 ± 0,06	0,5 ± 0,12	0,7 ± 0,19
AM	0,6 ± 0,09	0,6 ± 0,05	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,11
AM1	0,5 ± 0,08	0,5 ± 0,07	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,07
GLUC	0,5 ± 0,12	0,6 ± 0,11	0,5 ± 0,09	0,7 ± 0,08

$p<0.05$ comparados com os animais do grupo que receberam administração de solução salina tamponada (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni).

Tabela 6: Valores de proteinúria nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m	Tempo 7 X ± e.p.m	Tempo 15 X ± e.p.m	Tempo 30 X ± e.p.m
CONT	1,9 ± 0,13	1,6 ± 0,22	1,4 ± 0,08	1,3 ± 0,12
AM	2,4 ± 0,24	2,5 ± 0,28	1,7 ± 0,19	2,0 ± 0,15
AM 1	2,3 ± 0,11	2,2 ± 0,15	1,8 ± 0,16	1,7 ± 0,11
GLUC	1,9 ± 0,24	2,0 ± 0,21	1,6 ± 0,11	1,6 ± 0,13

$p<0.05$ comparados com os animais do grupo que receberam administração de solução salina tamponada (Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Bonferroni).

O Clearance da creatinina quantificado nos tratamentos com os três antimoniatos de meglumina estudados, não apresentou diferenças significativas entre os grupos, como pode ser observado na Tabela 5 Estudo de Sampaio e cols (1997) em humanos, mostrou queda na depuração de creatinina com administração de 40 mg SbV/kg/dia por 30 dias, porém tal queda não é inferior aos valores de referência normais para o índice de depuração, o que ressalta uma relativa a segurança na utilização terapêutica desses fármacos.

Visando ainda a avaliação de possível toxicidade renal, também foi realizada a dosagem de proteinúria como mostra a Tabela 6, pois em condições normais a membrana basal glomerular não permite a passagem da albumina e de proteínas de grande peso molecular. Em humanos, quantidades altas de proteína em uma amostra de urina, superiores a 250 mg de

albumina/24 h, é indicativo de lesão significativa na membrana glomerular (Graw, 2001).

Como pode ser observado na Tabela 6, foram identificados valores de proteinúria superiores ao grupo controle salina em todos os grupos tratados com antimoniais, no entanto, estas não foram significativas. Provavelmente, não correu comprometimento glomerular significativo a ponto de haver diferença estatística na análise bioquímica deste indicador de toxicidade renal.

Doseamentos de potássio e sódio urinários, também foram realizados para avaliação de possível toxicidade renal, e as variações destes teores em relação ao período anterior ao início dos tratamentos (Tempo 0), foram calculadas e encontram-se representadas na Figura 12.

Em condições normais, são ingeridos 60 a 100 mmol/dia de K^+ os quais são absorvidos e rapidamente distribuídos para os tecidos. A quantidade deste íon excretado na urina varia com o conteúdo da dieta, sendo que normalmente, pequena quantidade é captada pelas células e a maior parte é excretada pelos rins. No entanto, o controle da excreção renal é realizado por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Quase todo o K^+ filtrado pelo glomérulo é reabsorvido no túbulo proximal e menos de 10% atinge o túbulo distal, onde ocorre a principal regulação do íon. A excreção de K^+ em resposta às variações na ingestão tem lugar no túbulo distal, no túbulo coletor do córtex e no ducto coletor. O movimento do K^+ para o lúmen depende da existência da captação suficiente de Na^+ pelo túbulo distal, também como, do fluxo urinário e da concentração do K^+ na célula tubular. A concentração do K^+ na célula tubular deriva-se fundamentalmente da ação da Na^+K^+ATPase para o intercâmbio do íon com o líquido peritubular. O mecanismo é afetado por mineracorticóides, variações ácido-base e pelo teor de K^+ no líquido extracelular. O K^+ da célula tubular aumenta na hipercalemia pelo excesso de mineralocorticóides e na alcalose, mecanismos que tendem a incrementar a excreção de K^+ (Motta, 2003).

A hipercaliúria acontece no hiperaldosteronismo primário ou secundário, enfermidades renais primárias, síndromes tubulares renais, durante as fases de recuperação da necrose tubular renal aguda, acidose metabólica e alcalose metabólica (Motta, 2003).

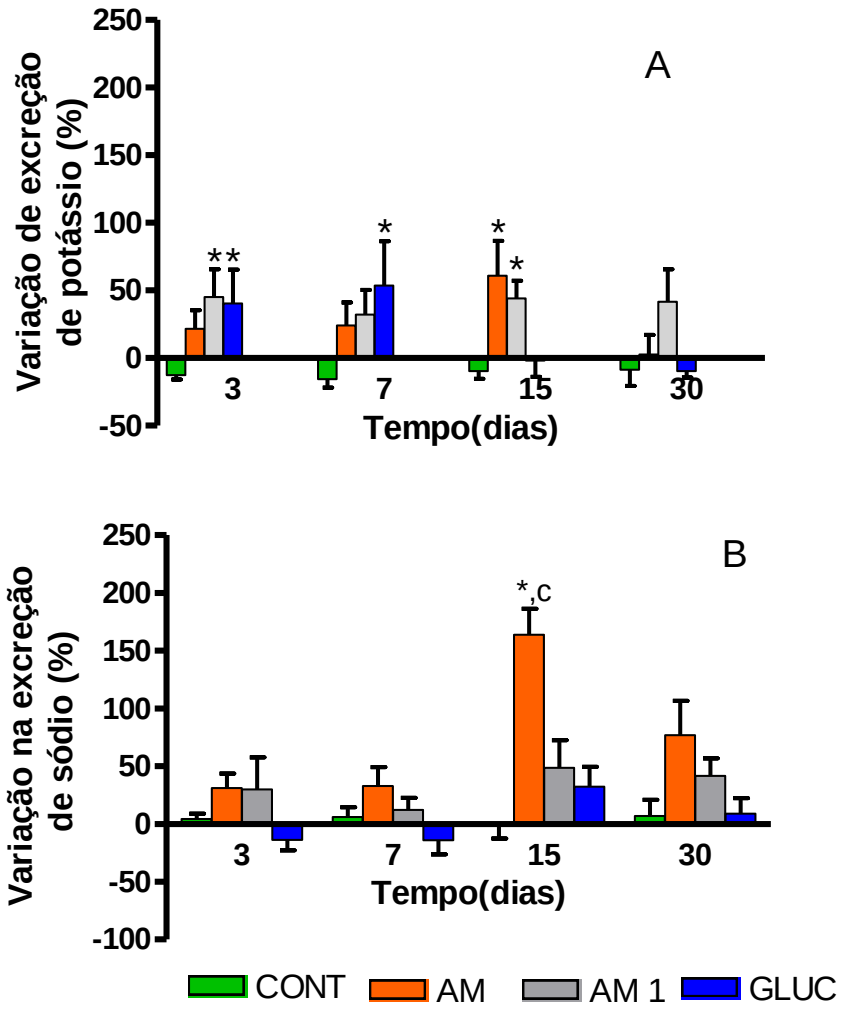


Figura 12: (A):Valores de variação de potássio (B): valores de variação de sódio excretado na urina em 24 horas após administração VIP dos fármacos ou salina tamponada (n=8/grupo) por 3,7,15 ou 30 dias * diferença significativa entre os grupos que receberam antimoniais pentavalentes e salina tamponada ($p < 0.05$)

Os resultados das dosagens de potássio realizadas, revelaram no grupo controle variação negativa, não significativa, em todos os tempos de análise, indicativa de diminuição na excreção urinária de potássio em relação ao período controle inicial. Inversamente, no entanto, a administração sub-aguda dos antimoniais induziu variação positiva nos níveis de potássio, tendo sido identificada diferença significativa em relação ao grupo controle no tempo 3 dias (-12,6%), para os grupos tratados com AM1 (45,0%) e GLUC (40,4%), e no tempo 15 dias, para os grupos que receberam AM (60,9%) ou AM1 (44,2%) também em relação ao grupo controle (-9,6%) (Figura 12 A e Tabela 15-anexo). Tais variações, poderiam ser explicadas pelo elevado teor de potássio residual encontrado nestes compostos antimoniais (Tabela 3) sendo os teores residuais desse íon

nos fármacos iguais a: 39,0 mmol/L (AM), 113,0 mmol/L (AM1) e 10,2 mmol/L (GLUC), superiores aos valores encontrados no soro em humanos (4,5 mmol/L).

O grupo tratado com Glucantime® mostrou variações significativas nos tempos iniciais do tratamento, 3 (40,4%) e 7 dias (53,6%) em relação ao grupo controle (-12,6% e -15,7% para 3 e 7 dias respectivamente), porém nos tempos 15 e 30 dias, há uma inversão nesta variação que poderia ser explicado por um retorno ao equilíbrio eletrolítico normal após a primeira semana de tratamento, uma vez que a quantidade de potássio neste composto está relativamente mais próxima dos valores séricos. Fato semelhante parece ocorrer com o grupo AM, porém o organismo do animal parece necessitar de um tempo maior para retornar ao equilíbrio eletrolítico após administração deste fármaco.

Já o grupo tratado com AM1 apresentou valores positivos de variação de excreção de potássio mais elevados que o grupo controle durante todos os tempos de análise, não retornando ao equilíbrio eletrolítico como os demais, sugerindo que o elevado teor de potássio identificado neste composto (113,0 mmol/L), seja um dos responsáveis por tal fato; podendo-se ainda considerar a hipótese de ter ocorrido lesão nos túbulos proximais, o que acarretaria uma maior excreção de potássio, com a conseqüente variação positiva encontrada.

Os rins têm a capacidade de conservar ou excretar grandes quantidades de sódio (Na^+) dependendo do conteúdo do mesmo no líquido extracelular e do volume sanguíneo. Normalmente, 60-75% do Na^+ filtrado é reabsorvido no túbulo proximal e parte é também reabsorvida nos túbulos distais e alça de Henle e, sob o controle do sistema renina-angiotensina-aldosterona, parte é trocado pelo K^+ e hidrogênio, mecanismo este que aumenta o volume de líquido extracelular. (Motta, 2003).

Os antimoniais pentavalentes, embora tenham rápida excreção renal, quando utilizados em doses convencionais ou mais elevada e por tempo mais prolongado podem provocar alterações na função renal (Sampaio, De Paula *et al.*, 1997). O aumento na fração de excreção de sódio, índice de função tubular sugere que em doses elevadas (acima 20 mg SbV/kg), o antimonial pentavalente pode determinar disfunção tubular renal, mas tal alteração mostra-se reversível com a interrupção do tratamento (Sampaio, De Paula *et al.*, 1997). Além disso, Marsden (1985) relatou que, lesões glomerulares devido à toxicidade do Sb são raras, mas os problemas tubulares são comuns principalmente com altas doses de antimônio, sendo os defeitos tubulares aparentemente baseados em dois mecanismos: ação inibitória sobre o hormônio antidiurético e efeitos tóxicos diretos nas células tubulares. Em baixas doses do antimônio, no entanto, as complicações renais são incomuns.

Assim, sendo a fração de excreção de sódio um índice de função tubular (Motta,

2003), ela também foi avaliada neste trabalho como um possível indicativo de toxicidade renal. Os resultados apresentados acima na Figura 15 B e na Tabela 16 (anexo) mostram que durante os 30 dias de tratamento pequena variação no grupo controle foi observada, o que ressalta a não interferência do tratamento com salina na excreção de sódio. Já os grupos tratados com AM e AM1 apresentaram, após 3 e 7 dias de tratamento, uma pequena variação positiva na excreção de sódio, as quais não são significativas em relação ao controle; porém pode ser considerada a hipótese de possível interferência no hormônio antidiurético (ADH) ou defeito tóxico direto nas células tubulares (Veiga, Khanam *et al.*, 1990). Por outro lado, o grupo tratado com GLUC parece necessitar de um tempo maior para atuar na variação de excreção de sódio, comparado aos outros grupos tratados com AM e AM1, uma vez que somente após 15 e 30 dias de administração, estas variações aumentaram passando a ser positiva. No entanto, diferença significativa foi observada apenas no grupo que recebeu AM por 15 dias (163,8%) de tratamento em relação ao grupo controle (-0,6%). Essa variação na fração de sódio excretada poderia ser decorrente do maior teor de SbIII residual presente no AM, o que desencadearia algum dano renal atribuído a toxicidade do antimônio trivalente em células mamíferas (Dzamitika *et al*., 2006).

Estudo anterior da toxicidade dos antimoniais, também realizado em ratos mostrou que o antimonial administrado na dose de 300 mg de SbV/kg/dia, por 30 dias provocou alterações tubulares renais sem afetar de modo significativo à função glomerular. Já a dose de 2000 mg/kg/dia por 30 dias alterou de modo significativo à taxa de filtração glomerular aumentando a fração de excreção de sódio. No mesmo estudo, não foram observadas alterações histopatológicas nos rins dos animais tratados com a menor dose (Veiga, Khanam *et al.*, 1990).

B. Protocolo agudo em Dose Única

As análises bioquímicas de avaliação de toxicidade renal basearam-se principalmente em amostras urinárias coletadas num período de 24 horas no protocolo sub-agudo por 30 dias. Assim, estas ficaram inviáveis de serem repetidas no protocolo agudo em dose única o qual se restringiu à análise histológica dos órgãos.

C. Análise Histológica

A análise histológica dos rins, corados por HE, após administração por até 30 dias de AM, AM1 ou GLUC, não apresentou alterações teciduais relevantes quando comparadas ao grupo controle salina. No entanto, após a administração de dose única de 500 mg/kg de AM1 e GLUC, observou-se uma leve congestão o que não ocorreu no grupo CONT e AM.

A análise concomitante das alterações de depuração de creatinina, proteinúria e dosagens de sódio e potássio urinários observadas no tratamento pelos fármacos AM, AM1 e GLUC nos protocolos sub-agudo e agudo associado à análise histológica, mostrou uma leve alteração renal devido ao aumento significativo na variação de potássio (AM-15; AM1- 3 e 15 e GLUC-3 e 7 dias) e sódio (AM- 15 dias). No entanto, a análise histológica apresentou uma leve congestão tecidual apenas no tratamento agudo, resultados estes indicativos da não ocorrência de lesões renais. Assim, as condições experimentais empregadas no desenvolvimento deste trabalho não induziram alterações renais significativas, o que pode ser um indicativo de relativa segurança no uso destes fármacos.

5.6. Avaliação da atividade cardiovascular

A. Protocolo sub-agudo por até 30 dias

A1. Doseamento da creatino quinase fração MB (CKMB)

A elevação da atividade plasmática da CKMB é o indicador mais específico de lesão miocárdica, particularmente, de infarto agudo do miocárdio (Motta 2003). Assim, ensaios de atividade de CKMB séricos são importantes ferramentas que auxiliam não apenas para diagnóstico precoce de infarto do miocárdio, como também a identificação de injúrias no miocárdio (Liu *et al* 2008).

Tabela 7: Valores séricos de CKMB nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m	Tempo 7 X ± e.p.m	Tempo 15 X ± e.p.m	Tempo 30 X ± e.p.m
CONT	2564 ± 266,1	2259 ± 304,9	3215 ± 74,3	2844 ± 39,9
AM	1114 ± 249,8	2052 ± 279,3	1194[*,c] ± 139,7	2171 ± 192,0
AM 1	2098 ± 303,8	1612 ± 334,6	2787 ± 172,6	2215 ± 144,6
GLUC	1302 ± 322,4	2235 ± 298,6	2521 ± 244,7	2542 ± 333,8

$p<0.05$ comparados com os animais do grupo que recebeu administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni).

No doseamento de CKMB (Tabela 7) realizado neste trabalho, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos que receberam AM, AM1 ou GLUC e o grupo controle, exceto para o grupo AM no tempo de 15 dias (1194 U/L), onde foi observada diminuição significativa no teor de CKMB em relação ao grupo controle (3215 U/L). Tal redução pode ser devida a um interferente relacionado à uma possível variação inerente a este grupo de animais, pois também foram identificadas esta ocorrência nas dosagens bioquímicas de AST e ALT neste mesmo grupo tratado por 15 dias.

Deve ser salientado, que os valores de CKMB identificados para o grupo controle no modelo rato são da ordem de 2000 U/L, ao passo que em humanos os valores considerados normais são de até 25 U/L. Não foram encontrados em literatura valores referenciais para o modelo rato, no entanto diferentes trabalhos realizados neste modelo animal apresentam ampla variação nas quantidades de CKMB identificadas nos grupos controle, sendo encontrado valores de 20 U/L (Kurata *et al*., 2007), 200 (Wei *et al*., 2005) e trabalho de Liu e cols (2008), que identificaram a mesma ordem de grandeza encontrada neste trabalho, ou seja cem vezes maior que os dado de humanos.

Assim, como não foram identificadas alterações significativas de CKMB e também de AST, dosagem indicativa lesão hepática e também cardíaca, pode ser inferido que os fármacos avaliados não causaram lesões cardíacas, nas condições deste protocolo; e ainda que, a elevação de AST aos 30 dias do grupo que recebeu o fármaco comercial (Figura 11) corresponderia apenas a leves alterações hepáticas, pois não se observou histopatologicamente maiores danos

no fígado.

A2. Avaliação de sinais de ECG e PA

A principal reação adversa observada com o uso terapêutico do antimoniato de meglumina é decorrente de sua ação sobre o sistema cardiovascular, levando principalmente a distúrbios da repolarização, sendo dose e tempo dependentes, por isto o Ministério da Saúde preconiza a importância da monitorização de ECG durante o tratamento com antimoniais. No momento do diagnóstico, é indicada a realização do ECG em todos os casos de LV, sendo obrigatório nos pacientes acima de 50 anos de idade, no início, durante e após o tratamento. Assim, por serem fármacos potencialmente arritmogênicos, os antimoniais pentavalentes são contra-indicados em pacientes que utilizam beta-bloqueadores ou anti-arrítmicos e em pacientes com insuficiência renal ou hepática e em casos de ocorrência no ECG, de intervalo QTc superior a 400 ms em homens e 450 ms em mulheres (Ministério da Saúde, Brasil, 2006).

Neste trabalho foram avaliados os sinais de ECG e PA obtidos dos animais que receberam AM, AM1 e GLUC por até 30 dias, visando à identificação de possível toxicidade cardiovascular. Os valores absolutos dos parâmetros do ECG e da PA obtidos nos grupos submetidos á administração sub-aguda estão apresentados na Tabela 17- anexo. As variações percentuais obtidas em relação ao tempo controle de cada grupo, ou seja, nos mesmos animais antes da administração dos antimoniais, estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

Para o intervalo PR do ECG, que corresponde à despolarização inicial dos átrios e à condução pelo nodo AV, não foi observada diferença significativa entre os fármacos avaliados e desses em relação ao grupo controle (Figura 13 A e Tabela 17- anexo). Também não foi observada diferença ao longo do tempo para um mesmo tratamento. Apesar disso, variações da ordem de 20% foram observadas após a administração de AM, AM1 e GLUC, indicando sua influência sobre a atividade cardíaca. Além disso, a similaridade das respostas entre estes fármacos para o intervalo PR indica baixa, porém semelhante toxicidade para esse parâmetro.

Para o complexo QRS do ECG, parâmetro que corresponde à despolarização dos ventrículos, não foi observado diferença significativa entre os grupos controle e os que receberam os três antimoniatos de meglumina, exceto para o grupo que recebeu AM1 no tempo de 15 dias (AM1 28,8% e AMcont 23,1%) (Figura 13 B e Tabela 17- anexo). Assim, como para o intervalo PR, também foi observado aumento nos valores do complexo QRS induzido por

AM, AM1 e GLUC e, embora este aumento não tenha sido significativo, indicando alteração mais intensa no tempo de 15 dias. É possível que a alteração observada em 15 dias, principalmente para o AM1, não tenha sido mais observada após 30 dias de tratamento devido à atuação de mecanismos compensatórios produzidos, por exemplo, pela atividade colinérgica ao nível cardíaco (Guyton e Hall, 2002; Weir e Dzau, 1999)

O intervalo QT do ECG, parâmetro que corresponde à sístole elétrica ventricular total (Feldman e Goldwasser, 2004) é amplamente utilizado como determinante de toxicidade de fármacos pró-arrítimicos e, quando associado ao prolongamento de QTc e mudanças no segmento ST são preditivas de séria cardiotoxicidade por arritmias podendo causar a morte (Crumb e Cavero, 1999). Day e cols (1990) sugeriram que a dispersão do intervalo QT pode ser indicativo de risco de arritmia. No presente trabalho foi observado que os fármacos AM e AM1 após administração sub-aguda, induziram ao aumento do intervalo QT em relação ao grupo controle, sugerindo ocorrência de toxicidade cardíaca. Essas alterações foram significativas nos tempos de 15 (AM 89,3% e AM_{cont} 71,8%) e 30 dias (AM 88,4% e AM_{cont} 72,2%) para o AM e nos tempos 7 (AM1 103,2% e $AM1_{cont}$ 84,0%) e 15 dias (AM1 115,1% e $AM1_{cont}$ 92,2%) para o AM1. Para o GLUC não foi observada diferença significativa, embora tenha induzido a aumentos da ordem de 10% (Figura 13 C e Tabela 17- anexo).

No presente trabalho, o parâmetro QTc, intervalo QT do ECG corrigido pela freqüência cardíaca, foi obtido segundo a fórmula de Fridericia: $QTc = QT/\sqrt[3]{RR}$. Segundo Abernethy e cols (2001), QTc é corrigido por esta fórmula quando RR<500 ms, como os valores absolutos obtidos aqui (Tabela 17- anexo), e por Bazett quando RR>500 ms. Quanto a este parâmetro, foram observados aumentos significativos induzidos por AM em todos os tempos avaliados, sendo observado os seguintes valores para o período controle e após administração: 131,0% e 161,8% para o tempo de 3 dias; 137,5% e 158,8% para 7 dias; 138,4% e 166,2% para 15 dias e 135,6% e 135,6 % para 30 dias**.** Após sete dias de administração do AM1 (AM1 181,7% e $AM1_{cont}$ 157,4%) também foi verificada diferença significativa (Figura 13 D e Tabela 17-anexo). Estas variações de QT e de QTc para AM e AM1, são indicativos de que esses dois compostos podem induzir à cardiotoxicidade nas condições experimentais empregadas, o que não foi observado para o GLUC, grupo que não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle em nenhum dos tempos avaliados para ambos os parâmetros QT e QTc. Possivelmente estas alterações induzidas pelo AM observadas nos parâmetros QT e principalmente QTc, onde foi identificada diferença significativa em todos os tempos de análise, podem estar relacionadas ao maior teor de SbIII residual presente neste fármaco (0,20%), como descrito anteriormente para alterações de amilase e fosfatase alcalina. Por outro lado, o elevado

teor de potássio residual em AM1 (113 mmol/L) pode ser considerada como hipótese da indução das variações causadas por AM1 nos dados de QT e QTc. .

Esses resultados são condizentes com dados da literatura que mostram a ocorrência de prolongamento do intervalo QT e QTc com a administração do antimoniato de meglumina. Em ensaio clínico randomizado realizado em 2000, com 63 pacientes recebendo 15 mg SbV/kg/dia de estibogluconato de sódio ou antimoniato de meglumina por 20 dias, cerca de um quinto dos pacientes apresentando ECG normal antes do início do tratamento apresentaram alterações ao longo do estudo, mas nada que justificasse a interrupção do tratamento. A freqüência das alterações foram similares nos dois grupos terapêuticos e as ocorrências mais comuns foram distúrbios de repolarização e aumento do intervalo QTc (Deps, Viana *et al.*, 2000). Lacerda Júnior e cols (1965), observaram em 10 pacientes que receberam 0,42 g de Glucantime® por via endovenosa durante 12 a 14 dias consecutivos, um prolongamento de QTc, mas estas alterações se mostraram reversíveis após a interrupção do tratamento. Lawn e cols (2004), também observaram em 60 pacientes britânicos com LC ou LM, tratados com 20 mg/kg/dia com Pentostam® por 21 (LC) ou 28 dias (LM), que cerca de 32 % dos pacientes apresentaram anormalidades no ECG, sendo as principais alterações o aumento de QTc após a terceira semana de tratamento e inversão de onda T. Estudo de Saldanha e cols (2000) utilizando a mesma dose por 20 dias de Glucantime® ou genérico de estibogluconato de sódio, em 111 pacientes com LC também relataram alteração em QTc e afirmam que, independentemente da presença de fatores que aumentem o risco de doença cardíaca, é necessária avaliação eletrocardiográfica durante o tratamento com antimoniais pentavalentes. No Quênia, Chulay e cols (1985), observaram alterações do ECG em 54% dos pacientes tratados com estibogluconato de sódio: 2/9 pacientes tratados com 10 mg SbV/kg/dia; 25/48 pacientes tratados com 20 mg Sb/kg/dia e 8/8 pacientes tratados com 40-60 mg Sb/kg/dia. Houve prolongamento de QT em 13 pacientes, todos recebendo dose acima de 20 mg de Sb/kg/dia.

A literatura apresenta alguns possíveis mecanismos de ocorrência destas alterações, como Tan, Hou e cols (1995) e Ribeiro e cols (1999), que descreveram o retardo da repolarização ventricular como possível causa do prolongamento do intervalo QT. Recentemente, Dennis *e cols* (2007), descreveram a inibição do tráfego de canais $hERG/_{IK}$ para a superfície da célula como um possível mecanismo para o aumento de intervalo QT induzido por fármacos (LQTS), tendo atribuído esse novo mecanismo ao trióxido de arsênio, pentamidina, probucol, fluoxetina e tártarato emético (SbIII).

A administração de antimoniais pentavalentes no protocolo sub-agudo (dose de 50 mg SbV/Kg/dia por até 30 dias) não alterou significativamente a pressão arterial quando

comparados ao grupo controle (PAS 103,8 e PAD 67,2 mmHg), exceto para o AM1 no tempo de 15 dias (PAS 63,0 e PAD 47,4 mmHg), quando foi observado hipotensão significativa, mas que não foi observada no tempo de 30 dias, possivelmente pela atuação de mecanismos compensatórios de regulação da PA, como maior ativação do sistema renina angiotensina (Weir e Dzau, 1999; Guyton e Hall, 2002; Qin, 2008) Essas observações sugerem relativa segurança na utilização desses fármacos nas condições utilizadas neste protocolo no que se refere à PA (Figura 14 A e B e Tabela 17- anexo).

Para a FC foi observado bradicardia significativa apenas para o grupo que recebeu AM no tempo de 15 dias (AM 392 bpm e AM_{cont} 432 bpm) e não houveram diferenças entre os grupos para os outros tempos (Figura 14 C e Tabela 17-anexo). A FC pode ser alterada principalmente por ações reflexas conseqüente a ações regulatórias da PA, por mediadores do SNA ou como conseqüência direta da ação de fármacos na atividade marcapasso cardíaca (Herring et al.,2002; Guyton e Hall, 2002). No presente trabalho, essas variações não são conclusivas, principalmente pelo fato do sinal de ECG ter sido obtido em animais anestesiados em que a atividade do SNA pode estar mascarada, mas, por outro lado, podem ser indicativas de alterações pelo fato de ter sido comparado a animais do grupo controle nas mesmas condições.

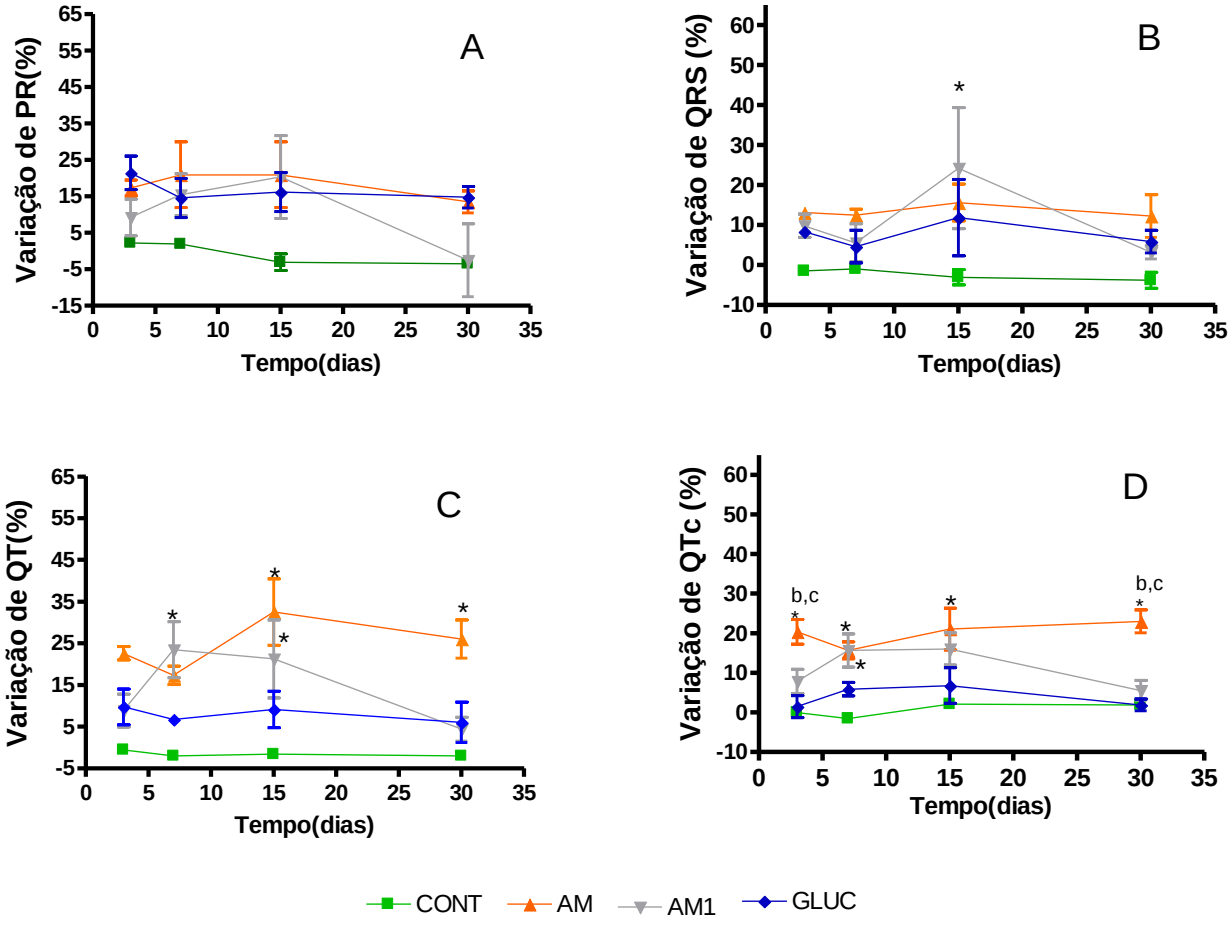


Figura 13: Variações de Intervalos de ECG: (A):intervalo PR, (B):intervalo QRS, (C):intervalo QT e (D): intervalo QTc após administração VIP. dos fármacos ou solução salina tamponada durante o período de 30 dias (n=8/grupo)

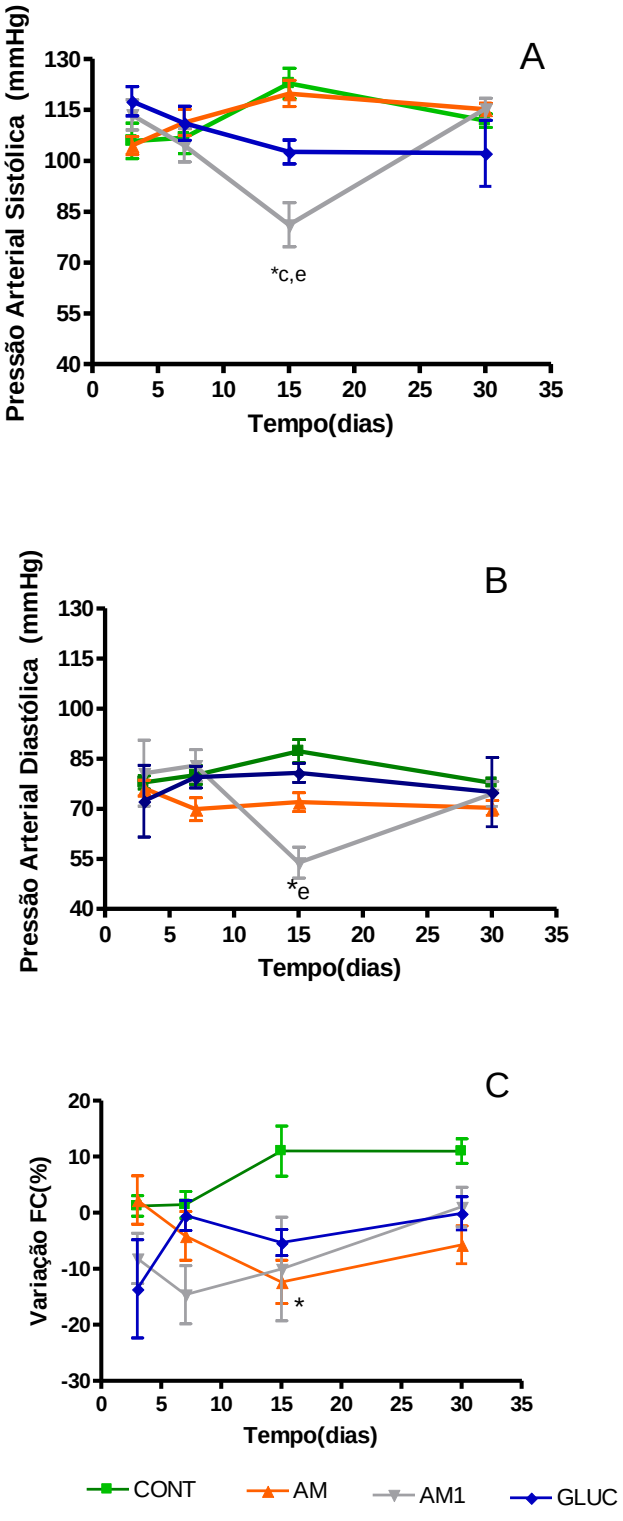


Figura 14: (A): variação de Intervalo FC; (B): médias dos valores absolutos de PAS (pressão arterial sistólica) e (C) média dos valores absolutos de PAD (pressão arterial diastólica) após administração VIP. dos fármacos ou solução salina tamponada durante o período de 30 dias (n=8/grupo).

B. Protocolo agudo em Dose Única

B1. Doseamento da creatino quinase fração MB (CKMB)

A Tabela 8 a seguir mostra os valores obtidos de CKMB no protocolo agudo.

Tabela 8: Valores séricos de CKMB após administração de 500 mg Sb/kg/dia VIV contido nos fármacos (n=8/grupo)

Grupo	CKMB X ± e.p.m
CONT	2563,0 ± 407,30
AM	2177,0 ± 501,20
AM 1	2427,0 ± 308,80
GLUC	2202,0 ± 410,20

* p<0.05 comparados com os animais do grupo controle que receberam administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni)

Como ocorreu com as dosagens de CKMB no protocolo sub-agudo, não foram detectadas diferenças significativas dos grupos que receberam AM, AM1 ou GLUC em relação ao grupo controle mesmo no protocolo agudo com administração em dose única de 500mg de SbV/kg, sugerindo mais uma vez a não ocorrência de lesões cardíacas (Tabela 8).

Jolliffe e Henderson (1985) realizaram um estudo com 22 homens que receberam 600mg/dia de estibogluconato de sódio VIV por 10 dias e não observaram alterações bioquímicas de CKMB, LDH e uréia mostrando que o antimonial pentavalente pode não acarretar efeitos colaterais cardíacos sérios.

B2. Avaliação de sinais de ECG

Os valores absolutos dos parâmetros de ECG adquiridos nos grupos submetidos à administração VIV lenta de 500 mg Sb/kg em dose única dos fármacos avaliados no presente trabalho estão apresentados na Tabela 9 e nas Figuras 15 a 19.

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados em relação ao grupo controle e ao longo de uma hora após cada fármaco administrado. No entanto, ao serem avaliados conjuntamente os parâmetros cardiovasculares, pode ser observado que embora sem variações significativas o GLUC induziu a aumentos da ordem de 15% do intervalo PR e o

AM1 induziu a aumentos da ordem de 12% do intervalo QT, ambos um minuto após a administração. Além disso, o GLUC induziu á bradicardia mais intensa nos três primeiros minutos após a administração, o que não foi observado para os outros fármacos. A não observação de diferenças significativas em relação ao grupo controle, no protocolo agudo de dose única 500 mg de SbV/kg VIV, dose esta dez vezes maior que a utilizada no protocolo sub-agudo (50 mg Sb/kg/dia) ressalta a relativa segurança desses fármacos mesmo em doses elevadas, lembrando que documento produzido pelo Ministério da Saúde (2006) afirma que o efeito sobre o sistema cardiovascular é dose e tempo dependentes.

Em humanos, o tratamento com antimoniais determina profundas alterações eletrocardiográficas, mas reversíveis em tempo variável, após interrupção do tratamento, porém, dose superior a 20 mg/kg/dia de derivados antimoniais não é recomendada (De Lacerda Junior, Ferminiani *et al.*, 1965; Thakur, 1986).

Em estudo realizado por Ribeiro e cols (1999) em 62 pacientes com LC que receberam baixas doses de SbV (15 mg/kg/dia) em esquema curto (2 ciclos de 10 dias), não foi observada maior alteração no ECG, exceto significativo prolongamento no intervalo QTc, indicando principalmente alterações relacionadas à repolarização ventricular. Há muitos fármacos que, apesar de prolongarem o intervalo QTc (quinidina, procainamida, disopiramida, sotalol, amiodarona, antridepressivos tricíclicos, pentamidina, cetoconazol, eritromicina), são considerados seletivos e seguros. É recomendado, no entanto, cuidados especiais na combinação de antimoniato de meglumina com outros fármacos, em particular aqueles que aumentam o intervalo QTc (Ribeiro, Drummond *et al.*, 1999).

Jolliffe e Henderson (1985) em estudo com 22 homens que receberam 600 mg/dia de estibogluconato de sódio VIV por 10 dias, não observaram alterações na pressão arterial, intervalo PR, duração de QRS, QTc mostrando que o fármaco pode não acarretar efeitos colaterais cardíacos sérios uma vez que não houve alterações no ECG pronunciadas como era esperado.

Em estudo realizado na Guatemala com 40 pacientes com LC que receberam 20 mg SbV/kg/dia com administração de Pentostam®, só foram observados diminuição de onda T (50%), inversão de onda T (20%) e prolongamento de intervalo QT (0,43 antes para 0,46 após tratamento), alterações que se reverteram após conclusão do tratamento, sem necessidade de alterar o fármaco utilizado. Outro trabalho, também na Guatemala com 22 pacientes com LC recebendo 20 mg de SbV/kg/dia com administração de Glucantime®, foi relatado que em 1/4 dos pacientes houve aumento de AST , porém dentro dos limites de normalidade e redução da onda T (41%) (Herwaldt e Berman, 1992).

Semelhantemente a trabalhos realizados com seres humanos e acima relatados, onde pode ser observado que os efeitos cardiovasculares dos antimoniais pentavalentes podem ser apenas brandos a moderados, raramente necessitando descontinuação da terapia (Herwaldt e Berman, 1992), nossos resultados apresentaram relativa segurança na utilização do antimoniato de meglumina, independentemente da rota sintética utilizada para sua obtenção, no que se refere à toxicidade cardíaca.

Tabela 9 – Média dos valores absolutos de freqüência cardíaca e parâmetros eletrocardiográficos avaliados, em diferentes tempos, antes e após a administração VIV. de 500 mg Sb/kg (n = 8/grupo).

			500 mg Sb/kg	500 mg Sb/kg	500 mg Sb/kg
Parâmetros	Tempo (min)	CONT	AM	AM 1	GLUC
PR (ms)	0	54,4 ± 1,72	53,9 ± 2,51	52,3 ± 1,09	57,4 ± 0,29
	3	54,9 ± 1,97	54,4 ± 3,09	53,3 ± 1,08	59,9 ± 2,83
	5	54,8 ± 2,03	55,0 ± 3,04	53,4 ± 1,02	63,4 ± 4,51
	15	55,6 ± 2,26	56,1 ± 3,81	54,1 ± 1,12	67,6 ± 7,37
	30	56,4 ± 2,58	56,2 ± 2,74	53,6 ± 1,26	62,4 ± 4,06
	45	56,9 ± 2,81	58,5 ± 2,57	56,7 ± 1,84	65,0 ± 5,22
QRS (ms)	0	16,1 ± 0,52	15,1 ± 0,67	15,3 ± 0,29	16,3 ± 0,11
	3	15,9 ± 0,49	15,4 ± 0,77	15,5 ± 0,31	17,3 ± 0,12
	5	16,1 ± 0,42	15,3 ± 0,77	15,5 ± 0,34	17,0 ± 1,10
	15	16,0 ± 0,53	15,0 ± 0,72	15,4 ± 0,32	17,0 ± 0,83
	30	16,3 ± 0,55	15,6 ± 0,64	15,5 ± 0,29	16,4 ± 0,56
	45	16,3 ± 0,58	15,9 ± 0,59	16,2 ± 0,39	16,9 ± 0,65
QT (ms)	0	66,3 ± 0,79	60,8 ± 3,16	63,3 ± 0,97	64,4 ± 1,66
	3	65,3 ± 1,19	62,2 ± 0,39	66,5 ± 1,19	69,0 ± 2,08
	5	65,4 ± 1,17	62,4 ± 4,62	66,3 ± 0,48	68,0 ± 2,01
	15	65,5 ± 1,19	60,8 ± 3,44	65,6 ± 0,52	67,3 ± 0,19
	30	65,5 ± 1,15	61,2 ± 3,07	64,7 ± 0,56	66,2 ± 1,48
	45	65,4 ± 1,35	62,3 ± 2,85	66,1 ± 0,42	69,1 ± 2,41
QTc (ms)	0	118,8 ± 1,47	109,7 ± 6,71	117,8 ± 1,10	114,2 ± 3,72
	3	116,5 ± 1,89	111,2 ± 7,18	120,7 ± 2,00	111,5 ± 7,21
	5	115,8 ± 1,93	110,6 ± 7,83	120,8 ± 1,49	117,0 ± 1,75
	15	117,3 ± 1,65	106,7 ± 6,21	118,6 ± 2,45	115,7 ± 3,48
	30	116,7 ± 2,18	106,8 ± 5,93	118,8 ± 1,53	114,1 ± 3,37
	45	114,5 ± 1,97	106,9 ± 5,60	118,9 ± 1,72	117,1 ± 3,33
Frequência Cardíaca (bpm)	0	349 ± 19,3	356 ± 25,8	390 ± 14,7	341 ± 25,5
	3	345 ± 18,9	346 ± 25,9	360 ± 12,9	289 ± 43,8
	5	338 ± 20,6	338 ± 25,2	364 ± 13,5	314 ± 26,4

15	351 ± 21,8	331 ± 27,3	367 ± 15,0	313 ± 27,5
30	345 ± 22,3	321 ± 24,7	374 ± 19,3	313 ± 23,7
45	331 ± 26,6	304 ± 18,2	352 ± 19,3	303 ± 27,8

Os valores representam a média ± EPM.

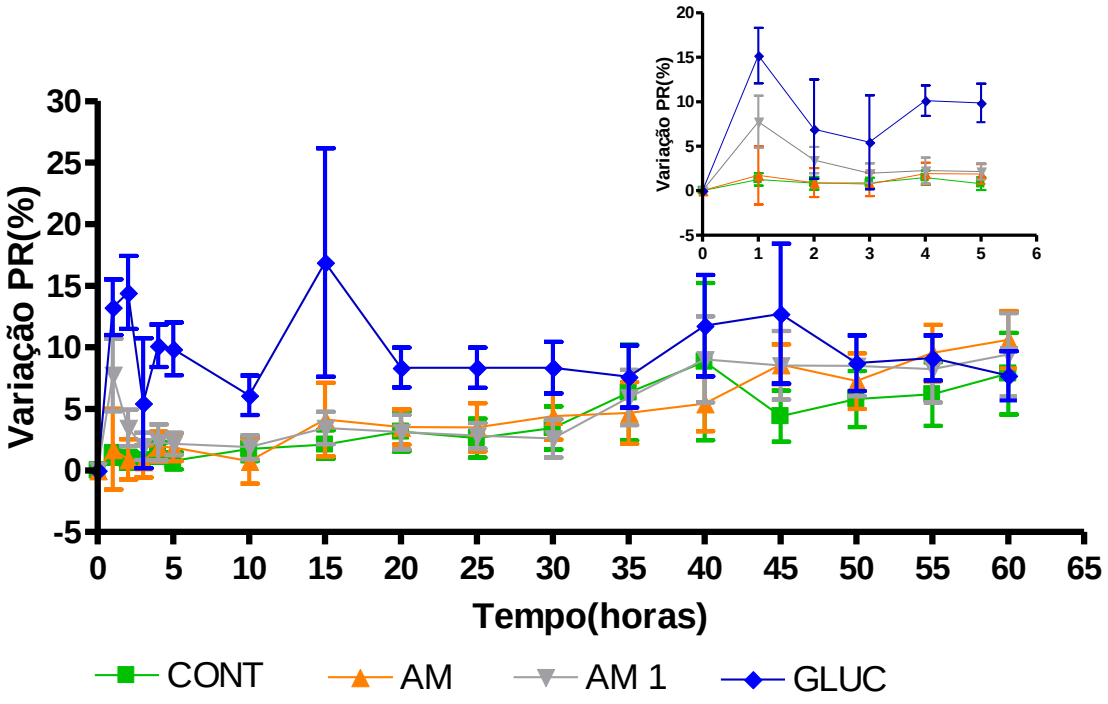


Figura 15: Variação de Intervalo PR durante 60 minutos após administração dos fármacos ou solução salina tamponada VIV. Em destaque, os primeiros 5 minutos após administração.

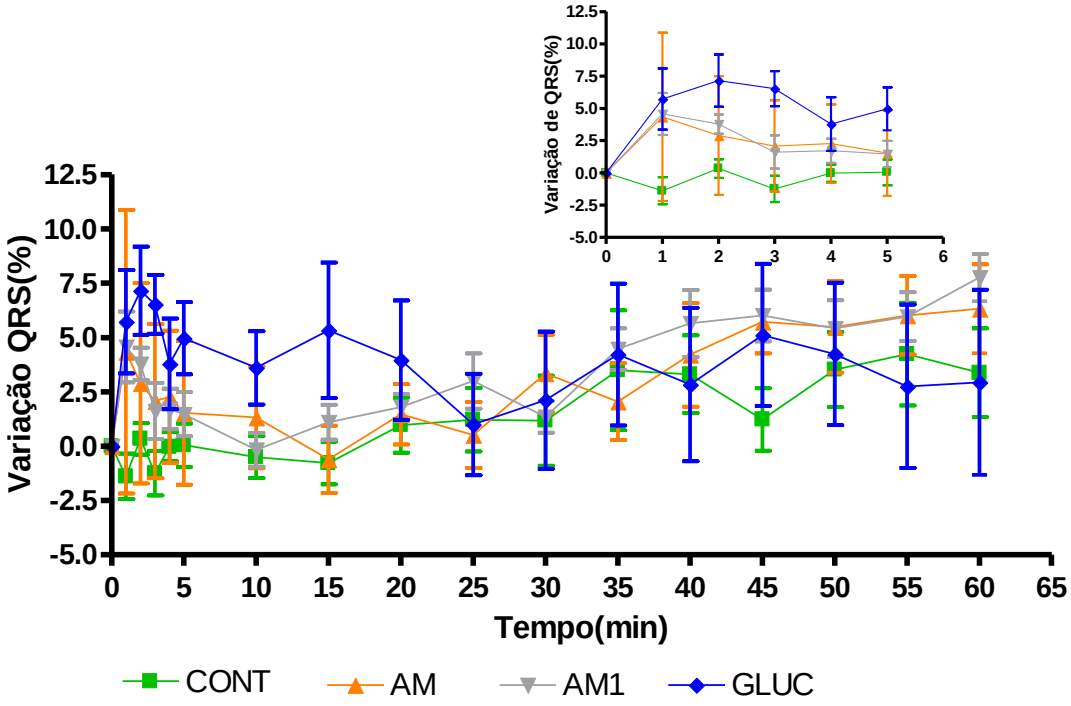


Figura 16: Variação de Intervalo QRS durante 60 minutos após administração dos fármacos ou solução salina tamponada VIV. Em destaque, os primeiros 5 minutos após administração

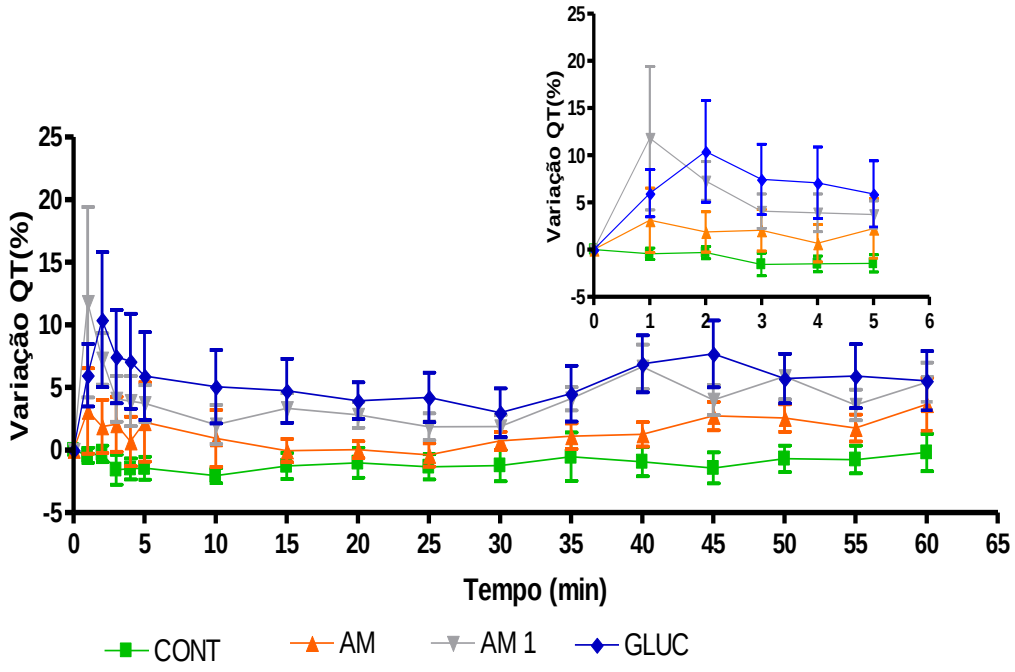


Figura 17: Variação de Intervalo QT durante 60 minutos após administração dos fármacos ou solução salina tamponada VIV. Em destaque, os primeiros 5 minutos após administração.

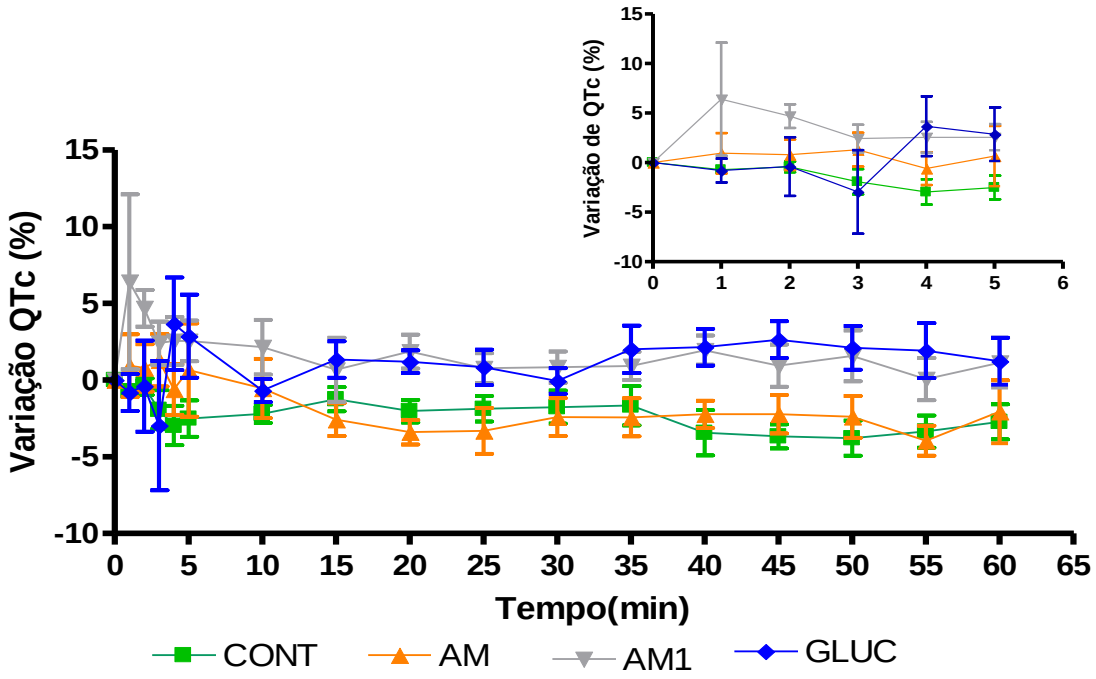


Figura 18: Variação de Intervalo QTc durante 60 minutos após administração dos fármacos ou solução salina tamponada VIV. Em destaque, os primeiros 5 minutos após administração

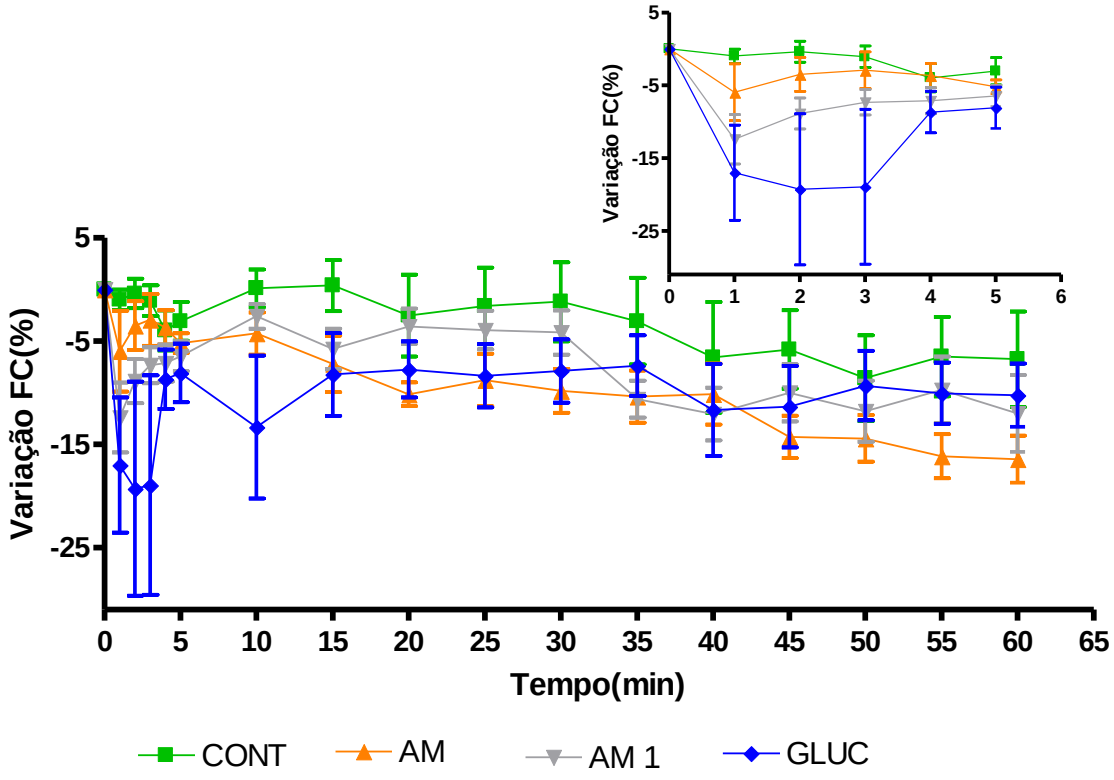


Figura 19: Variação de FC durante 60 minutos após administração dos fármacos ou solução salina

tamponada VIV. Em destaque, os primeiros 5 minutos após administração.

C. Análise Histológica

As Figuras abaixo 20, 21, 22 e 23 ilustram as cavidades cardíacas ao longo da administração VIP dos compostos antimoniais ou solução salina tamponada por até 30 dias. Não foram observadas alterações visíveis nestas cavidades, indicando o não remodelamento dos corações avaliados.

Figura 20: Cortes transversais de corações dos animais tratados com salina tamponada

3 Dias	7 Dias	15 Dias	30 Dias

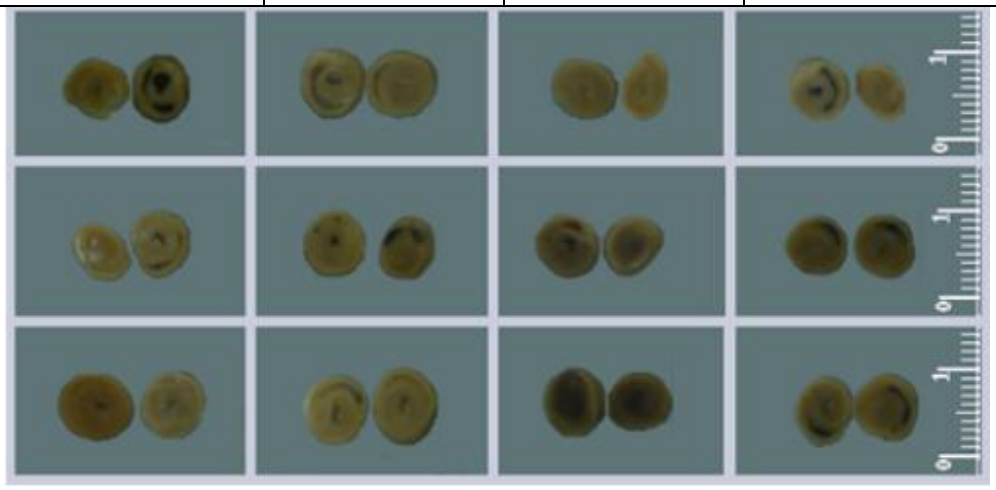


Figura 21:Cortes transversais de corações dos animais tratados com AM

3 Dias	7 Dias	15 Dias	30 Dias

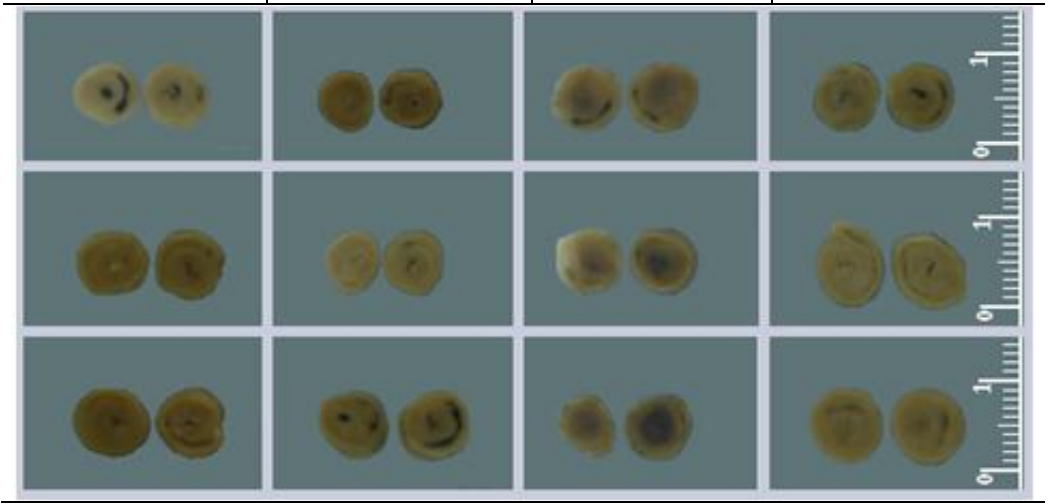


Figura 22: Cortes transversais de corações dos animais tratados com AM1

3 Dias	7 Dias	15 Dias	30 Dias

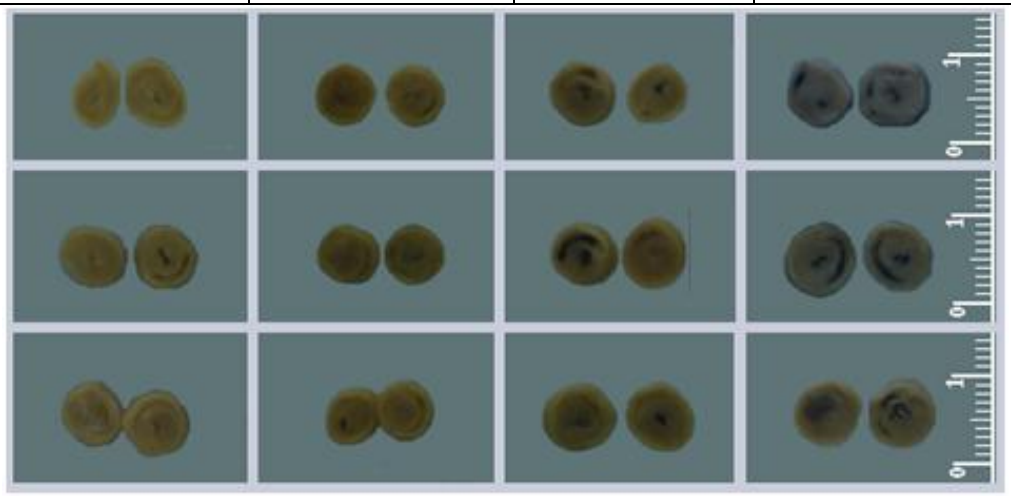
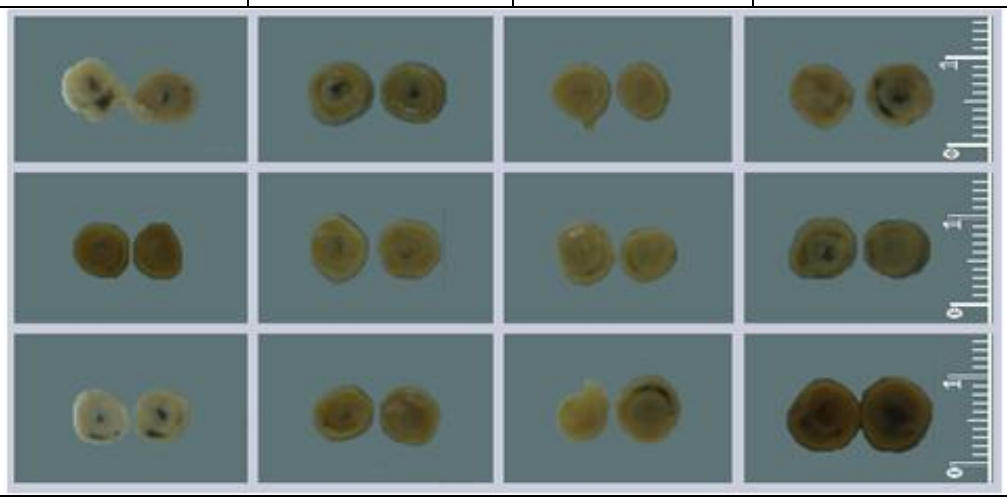


Figura 23: Cortes transversais de corações dos animais tratados com GLUC

3 Dias	7 Dias	15 Dias	30 Dias



A análise histológica do tecido cardíaco corado por HE não mostrou variações entre os grupos tratados e controle no tratamento sub-agudo. Todavia, no protocolo em dose única de 500 mg de Sb/kg VIV, observa-se uma leve congestão no tecido cardíaco nos grupos AM1 e GLUC (Figura 24).

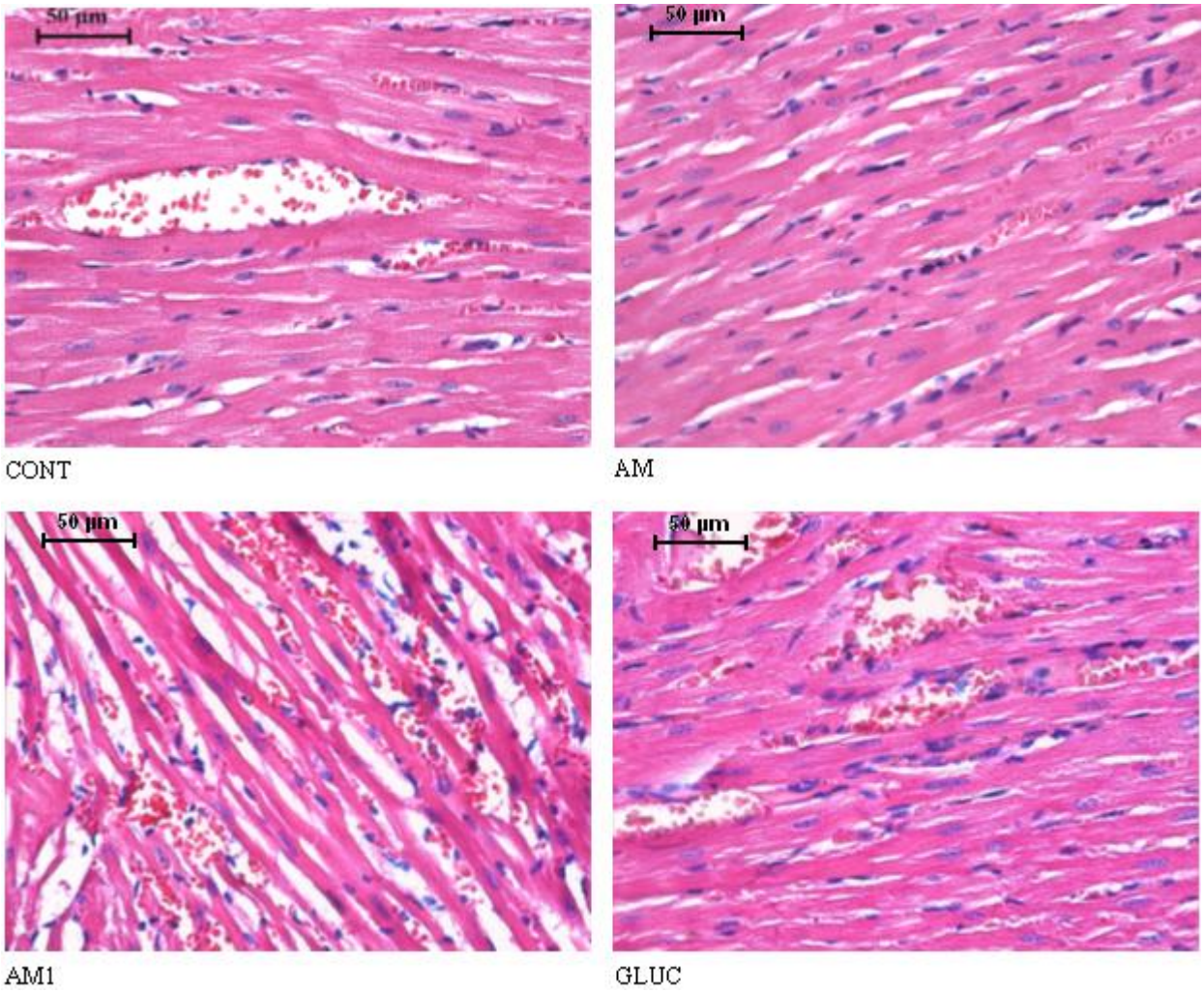


Figura 24: Prancha ilustrando coração de ratos que receberam 500 mg SbV /kg ou solução salina tamponada VIV (aumento 40 X) e coloração HE

Ao serem avaliados os dados bioquímicos de CKMB e AST associados à análise histológica e avaliação dos parâmetros cardiovasculares de ambos os protocolos sub-agudo e agudo podemos concluir que os fármacos testados, tanto na dose de 50 mg de Sb/kg/dia por 30 dias ou 500 mg de Sb/kg não acarretaram danos cardíacos significativos, indicando segurança na utilização destes fármacos nas condições estudadas. A não variação entre os resultados obtidos pelos compostos antimoniais brasileiros (AM e AM1) e Glucantime® mostram uma similaridade entre os mesmos.

5.7 Concentração sérica de Sb durante o tratamento sub-agudo

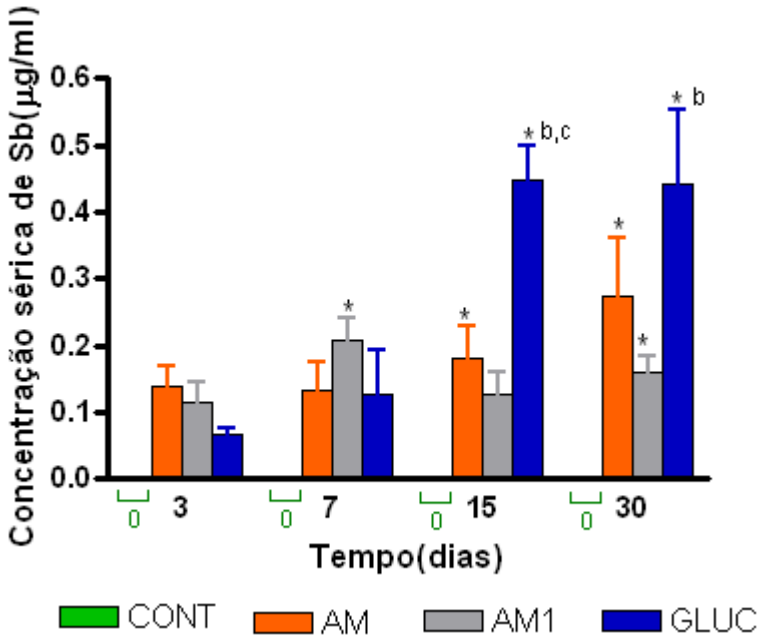


Figura 25: Concentração de Sb no soro de ratos após 24 horas da administração do fármaco tratados com 50 mg SbV/kg/dia VIP por até 30 dias * diferença significativa entre os grupos que receberam antimoniais pentavalentes e salina tamponada b- diferença comparada ao grupo que recebe AM1 c- diferença comparada ao grupo que recebeu GLUC ($p<0.05$)

Os resultados de quantificação dos teores de Sb total no soro realizados neste trabalho estão apresentados na Figura 25 e Tabela 18 (anexo). O grupo CONT, como esperado, não apresenta Sb sérico. Foram observadas diferenças significativas nos animais que receberam AM1 por 7 (0,21 µg/mL) e 30 dias (0,16 µg/mL) em relação ao grupo controle (0,00 µg/mL em ambos os tempos). Para o grupo que recebeu AM e GLUC, houve diferença significativa nos tempos de 15 (AM 0,18 e GLUC 0,45 µg/mL) e 30 dias de administração (AM 0,27 e GLUC 0,44

µg/mL) em relação ao grupo controle (0,00 µg/mL em ambos os tempos), porém o grupo que recebeu GLUC apresentou teores de Sb mais elevados, o que pode ser demonstrado através da diferença significativa no tempo de 15 dias em relação ao grupo AM e AM1 e, em 30 dias, em relação ao grupo AM1. Esses dados podem indicar a existência de uma diferença entre a disponibilização do Sb a partir do antimonial comercial e àquela a partir do antimonial sintético, seja AM ou AM1. Essa diferença poderia ser explicada por estados de polimerização diferentes entre o GLUC e o antimonial sintético. Autores relatam que AM1 pode apresentar diferentes estados de polimerização e que o AM é polimerizado em maior extensão; assim esta polimerização pode alterar a distribuição e disponibilidade do SbV e conseqüentemente os efeitos em humanos (Sundar, Sinha *et al.*, 1998).

Soto e cols (2004), ao compararem a eficácia de medicamento genérico de estibogluconato de sódio produzido na Índia com os medicamentos comerciais (Pentostam® e Glucantime®) em 114 pacientes com LC na Bolívia e Colômbia, observaram que o genérico é efetivo e bem tolerado no tratamento de leishmaniose cutânea nessas regiões; sendo que o custo do genérico representaria apenas 20% do preço das marcas comerciais. Outro estudo desenvolvido no Quênia comparando a efetividade do medicamento comercial e genérico de estibogluconato de sódio em 102 pacientes com LV, não identificou diferença entre as terapias (Moore, O'flaherty *et al.*, 2001)Este trabalho, por sua vez, ao comparar dois produtos brasileiros com o comercial (Glucantime®), apesar de não quanto à eficácia, mas quanto à possível toxicidade revelou que, nas condições experimentais empregadas, os produtos brasileiros são similares ao produto comercial o que sugere a possibilidade de serem comercialmente utilizados, provavelmente com menor custo, o que muito beneficiaria a população brasileira.

VI. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram relativa correlação de toxicidade do antimoniato com o maior teor residual de SbIII existente no fármaco estudado AM, quando o protocolo sub-agudo de administração foi aplicado, para os parâmetros bioquímicos fosfatase alcalina e variação na fração de sódio excretada, além dos parâmetros QT e QTc obtidos das análises do ECG.

Quanto a uma possível correlação entre os teores residuais de potássio e a toxicidade dos compostos antimoniais estudados, os resultados obtidos mostraram a possibilidade de indução de toxicidade renal e cardíaca por administração de AM1 (maior teor residual de K^+); também quando o protocolo sub-agudo de administração foi aplicado, na medida em que mostraram aumento na excreção urinária deste íon e .nos parâmetros QT e QTc, respectivamente.

Ao serem avaliados conjuntamente os dados obtidos neste estudo das análises bioquímica, histológica e de alterações de ECG e PA, foi observada relativa similaridade e segurança na administração de AM, AM1 e GLUC tanto no protocolo sub-agudo de avaliação da toxicidade, onde foi utilizada a dose de 50 mg SbV/kg/dia por até 30 dias, quanto no protocolo agudo, onde a dose dez vezes maior que a do protocolo sub-agudo (500 mg SV/kg) foi avaliada, uma vez que não houveram dados bioquímicos nem histológicos relevantes que evidenciassem lesões pancreáticas, hepáticas, renais ou cardíacas nessas condições experimentais e utilizando o modelo rato.

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abernethy, D. R., D. L. Wesche, *et al.* Stereoselective halofantrine disposition and effect: concentration-related QTc prolongation. Br J Clin Pharmacol, v.51, n.3, Mar, p.231-7. 2001.

Alarcón-Corredor, O. M., M. R. D. Fernández, *et al.* Alteraciones Enzimaticas Sericas En Ratas Tratadas Con Bisulfito De Sodio. Acta Científica Venezolana, v.51, n.4, p.257–263. 2000.

Al Jaser, M., A. El-Yazigi, *et al.* Skin uptake, distribution, and elimination of antimony following administration of sodium stibogluconate to patients with cutaneous leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother, v.39, n.2, Feb, p.516-9. 1995.

Alkhawajah, A., E. B. Larbi, *et al.* Subacute toxicity of pentavalent antimony compounds in rats. Hum Exp Toxicol, v.11, n.4, Jul, p.283-8. 1992.

Ballou, W. R., J. B. Mcclain, *et al.* Safety and efficacy of high-dose sodium stibogluconate therapy of American cutaneous leishmaniasis. Lancet, v.2, n.8549, Jul 4, p.13-6. 1987.

Beçak, W.; Paulete, J. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1976.

Behumer, O. A.; Tolosa, E. M. C.; Neto, A. G. F. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, EDART, Ed. Da Universidade de São Paulo, 1976.

Berhe, N., Y. Abraham, *et al.* Electrocardiographic findings in Ethiopians on pentavalent antimony therapy for visceral leishmaniasis. East Afr Med J, v.78, n.11, Nov, p.608-10. 2001.

Berman, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. Rev Infect Dis, v.10, n.3, May-Jun, p.560-86. 1988.

_____. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis, v.24, n.4, Apr, p.684-703. 1997.

Blum, J., P. Desjeux, *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. J Antimicrob Chemother, v.53, n.2, Feb, p.158-66. 2004.

Boelaert, M., D. Le Ray, *et al.* How better drugs could change kala-azar control. Lessons from a cost-effectiveness analysis. Trop Med Int Health, v.7, n.11, Nov, p.955-9. 2002.

Brasil.Ministério da Saúde.Secretaria de Vigilância em Saúde.Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnóstico clínico e diferencial. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006a. 136p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006b. 120 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção Leishmania-HIV. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2004. 72p.

Brochu, C., J. Wang, *et al.* Antimony uptake systems in the protozoan parasite Leishmania and accumulation differences in antimony-resistant parasites. Antimicrob Agents Chemother, v.47, n.10, Oct, p.3073-9. 2003.

Chulay, J. D., E. M. Anzeze, *et al.* High-dose sodium stibogluconate treatment of cutaneous leishmaniasis in Kenya. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.77, n.5, p.717-21. 1983.

Chulay, J. D., L. Fleckenstein, *et al.* Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.82, n.1, p.69-72. 1988.

Chulay, J. D., H. C. Spencer, *et al.* Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). Am J Trop Med Hyg, v.34, n.4, Jul, p.702-9. 1985.

Costantini S, Giordano R, Rizzica M, Benedetti F. Applicability of anodic-stripping voltammetry and graphite furnace atomic-absorption spectrometry to the determination of antimony in biological matrices: a comparative study. Analyst. v.110, n.11, p:1355-9. 1985

Crumb, W. e I. I. Cavero. QT interval prolongation by non-cardiovascular drugs: issues and solutions for novel drug development. Pharm Sci Technolo Today, v.2, n.7, Jul, p.270-280. 1999.

Cuce, L. C., W. Belda Junior, *et al.* [Renal changes caused by pentavalent antimonial (Glucantime) hypersensitivity in American tegumentary leishmaniasis. Report of a case]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.32, n.4, Jul-Aug, p.249-51. 1990.

Davidson, R. N. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. Drugs, v.56, n.6, Dec, p.1009-18. 1998.

Day, C. P., J. M. Mccomb, *et al.* QT dispersion: an indication of arrhythmia risk in patients with long QT intervals. Br Heart J, v.63, n.6, Jun, p.342-4. 1990.

Dennis, A., L. Wang, *et al.* hERG channel trafficking: novel targets in drug-induced long QT syndrome. Biochem Soc Trans, v.35, n.Pt 5, Nov, p.1060-3. 2007.

De Lacerda Junior, F. S., H. Ferminiani, *et al.* [Comparative study of electrocardiographic changes determined by treatment with tri- and pentavalent antimony]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.7, n.4, Jul-Aug, p.210-7. 1965.

De Oliveira, F. B., D. A. Schettini, *et al.* Kinetics of Antimony(V) Reduction by L-Cysteine. Pharmacological Implications and Application to the Determination of Antimony in Pentavalent Antimonial Drugs. J. Braz. Chem. Soc., v.17, n.8, p.1642-1650. 2006.

Delgado, J., J. Macias, *et al.* High frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. Am J Trop Med Hyg, v.61, n.5, Nov, p.766-9. 1999.

Demicheli, C., T. L. De Figueiredo, *et al.* Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. Biometals, v.12, n.1, Mar, p.63-6. 1999.

Demicheli, C. e F. Frézard. Novas Embalagens para medicamentos à Base de Antimônio Usados no Tratamento de Leishmaniose e Esquistossomose. Cadernos Temáticos De Química Nova Na Escola, v.6, julho 2005, p.24-30. 2005.

Demicheli, C., F. Frezard, *et al.* Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. Biochim Biophys Acta, v.1570, n.3, Apr 15, p.192-8. 2002.

Demicheli, C., R. Ochoa, *et al.* pentavalent organoantimonial drivates: two simple and efficient syntthetic methods for meglumine antimonate. Applied Organometallic Chemistry, v.17, p.226-231. 2003.

Dennis, A., L. Wang, *et al.* hERG channel trafficking: novel targets in drug-induced long QT syndrome. Biochem Soc Trans, v.35, n.Pt 5, Nov, p.1060-3. 2007.

Denton, H., J. C. Mcgregor, *et al.* Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. Biochem J, v.381, n.Pt 2, Jul 15, p.405-12. 2004.

Deps, P. D., M. C. Viana, *et al.* [Comparative assessment of the efficacy and toxicity of N-methyl-glucamine and BP88 sodium stibogluconate in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis]. Rev Soc Bras Med Trop, v.33, n.6, Nov-Dec, p.535-43. 2000.

Desjeux, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol, v.14, n.5, Sep-Oct, p.417-23. 1996.

_____. [Therapeutic options for visceral leishmaniasis]. Med Mal Infect, v.35 Suppl 2, Jun, p.S74-6. 2005.

Dos Santos Ferreira, C., A. M. De Castro Pimenta, *et al.* Characterization of reactions of antimoniate and meglumine antimoniate with a guanine ribonucleoside at different pH. Biometals, v.19, n.5, Oct, p.573-81. 2006.

Dzamitika, S. A., C. A. Falcao, *et al.* Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. Chem Biol Interact, v.160, n.3, Apr 15, p.217-24. 2006.

Ferreira Cdos, S., P. S. Martins, *et al.* Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and

glutathione. Biometals, v.16, n.3, Sep, p.441-6. 2003.

Franke, E. D., F. S. Wignall, *et al.* Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. Ann Intern Med, v.113, n.12, Dec 15, p.934-40. 1990.

Frezard, F., P. S. Martins, *et al.* New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. J Inorg Biochem, v.102, n.4, Apr, p.656-65. 2008.

Graw, A., Cowan, R.A., O´Reilly, D. St. J., Stewart, M.J., Shepherd, J., Bioquímica Clínica Segunda Edição . Rio de Janeiro.Ed.Guanabara Koogan, 2001.

Goldwasser, G. P. e J. Feldman. eletrocardiograma: recomendações para a sua interpretação. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro, v.17, n.4, p.251-255. 2004.

Goodwin, L. G. e J. E. Page. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. Biochem J, v.37, n.2, Jul, p.198-209. 1943.

Guerin, P. J., P. Olliaro, *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. Lancet Infect Dis, v.2, n.8, Aug, p.494-501. 2002.

Guyton, A.C e Hall, J.E., Tratado de Fisiologia Médica, 10 Edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2002

Haimeur, A., C. Brochu, *et al.* Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant Leishmania tarentolae. Mol Biochem Parasitol, v.108, n.1, Apr 30, p.131-5. 2000.

Henao, H. H., Y. Osorio, *et al.* [Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime and Pentostam) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application]. Biomedica, v.24, n.4, Dec, p.393-402. 2004.

Henderson, A. e D. Jolliffe. Cardiac effects of sodium stibogluconate. Br J Clin Pharmacol, v.19, n.1, Jan, p.73-7. 1985.

Hepburn, N. C., I. Siddique, *et al.* Hepatotoxicity of sodium stibogluconate in leishmaniasis. Lancet, v.342, n.8865, Jul 24, p.238-9. 1993.

Herring, N., E. J. Danson, *et al.* Cholinergic control of heart rate by nitric oxide is site specific. News Physiol Sci, v.17, Oct, p.202-6. 2002.

Herwaldt, B. L. e J. D. Berman. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg, v.46, n.3, Mar, p.296-306. 1992.

Ikeda-Garcia, F. A., R. S. Lopes, *et al.* Evaluation of renal and hepatic functions in dogs

naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. Res Vet Sci, v.83, n.1, Aug, p.105-8. 2007.

Kothari, H., P. Kumar, *et al.* Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in Leishmania donovani. Parasitol Int, v.56, n.1, Mar, p.77-80. 2007.

Koff, A. B. e T. Rosen. Treatment of cutaneous leishmaniasis. J Am Acad Dermatol, v.31, n.5 Pt 1, Nov, p.693-708; quiz 708-10. 1994.

Kuryshev, Y. A., L. Wang, *et al.* Antimony-based antileishmanial compounds prolong the cardiac action potential by an increase in cardiac calcium currents. Mol Pharmacol, v.69, n.4, Apr, p.1216-25. 2006.

Lawn, S. D., M. Armstrong, *et al.* Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis among returned travellers. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.100, n.3, Mar, p.264-9. 2006.

Lima, E. B. D., C. Porto, *et al.* Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.82, n.2, p.111-124. 2007.

Lima, M. V. N. D., R. Z. D. Oliveira, *et al.* Leishmaniose cutânea com desfecho fatal durante tratamento com antimonial pentavalente Anais Brasileiros de Dermatologia, v.82, n.3, p.269-271. 2007.

Liu, B., W. Li, *et al.* Protective effects of N-acetylcysteine in isoproterenol-induced myocardium injury in rats. Mol Biol Rep, Apr 4. 2008.

Lucumi, A., S. Robledo, *et al.* Sensitivity of Leishmania viannia panamensis to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. Antimicrob Agents Chemother, v.42, n.8, Aug, p.1990-5. 1998.

Mcbride, M. O., M. Linney, *et al.* Pancreatic necrosis following treatment of leishmaniasis with sodium stibogluconate. Clin Infect Dis, v.21, n.3, Sep, p.710. 1995.

Manson-Bahr, P. E. Leishmaniasis. Int Rev Trop Med, v.4, p.123-40. 1971.

Marsden, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. Rev Soc Bras Med Trop, v.18, n.3, p.187-198. 1985.

Moore, E., D. O'flaherty, *et al.* Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. Bull World Health Organ, v.79, n.5, p.388-93. 2001.

Motta,V.T., Bioquímica Clínica Para o Laboratório Princípios e Interpretações, 4 Edição. Porto Alegre. Editora Médica Missau, 2003.v. 1. 428 p.

Nieto, J., J. Alvar, *et al.* Pharmacokinetics, toxicities, and efficacies of sodium stibogluconate

formulations after intravenous administration in animals. Antimicrob Agents Chemother, v.47, n.9, Sep, p.2781-7. 2003.

Ouellette, M., J. Drummelsmith, *et al.* Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. Drug Resist Updat, v.7, n.4-5, Aug-Oct, p.257-66. 2004.

Peters, W. The treatment of kala-azar--new approaches to an old problem. Indian J Med Res, v.73 Suppl, Jan, p.1-18. 1981.

Qin, Z. Newly developed angiotensin II-infused experimental models in vascular biology. Regul Pept, v.150, n.1-3, Oct 9, p.1-6. 2008.

Rath, S., L. A. Trivelin, *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte Química Nova, v.26, n.4, p.550-555. 2003.

Rees, P. H., M. I. Keating, *et al.* Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate). Lancet, v.2, n.8188, Aug 2, p.226-9. 1980.

Ribeiro, A. L., J. B. Drummond, *et al.* Electrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. Braz J Med Biol Res, v.32, n.3, Mar, p.297-301. 1999.

Rijal, S., Chappuis, F., Singh, R., Boelaert, M., Loutan, L., Koirala, S. Sodium stibogluconate cardiotoxicity and safety of generics. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.97,n.5 , p597-598. 2003.

Ritmeijer, K., Veeken, H., Melaku, Y., Leal, G., Amsalu, R., Seaman, J., Davidson, R. N. Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent. HIV coinfected patients have a poor outcome. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 5, n.5: p668-672. 2001.

Roberts, W. L., J. D. Berman, *et al.* In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. Antimicrob Agents Chemother, v.39, n.6, Jun, p.1234-9. 1995.

Rodrigues, M. L., R. S. Costa, *et al.* Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.41, n.1, Jan-Feb, p.33-7. 1999.

Saldanha, A. C., G. A. Romero, *et al.* [Comparative study between sodium stibogluconate BP 88 and meglumine antimoniate in cutaneous leishmaniasis treatment. II. Biochemical and cardiac toxicity]. Rev Soc Bras Med Trop, v.33, n.4, Jul-Aug, p.383-8. 2000.

Sampaio, R. N., C. D. De Paula, *et al.* [The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop, v.30, n.6, Nov-Dec, p.457-63. 1997.

Sampaio, R. N. R., P. D. Marsden, *et al.* Avaliação do tratamento da leishmaniose cutâneo-mucosa com três esquemas diferentes de antimoniais pentavalentes Anais Brasileiros de Dermatologia, v.64, n.3, p.189-192. 1989.

Sampaio, R. N. R., R. A. A. Rocha, *et al.* Leishmaniose tegumentar americana. Casuística do Hospital Escola da UnB. . An. brasileiro Dermatologia, v.55, n.2, p.69-76. 1980.

Segura, I. e I. Garcia-Bolao. Meglumine antimoniate, amiodarone and torsades de pointes: a case report. Resuscitation, v.42, n.1, Sep, p.65-8. 1999.

Sereno, D., M. Cavaleyra, *et al.* Axenically grown amastigotes of Leishmania infantum used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. Antimicrob Agents Chemother, v.42, n.12, Dec, p.3097-102. 1998.

Sereno, D., P. Holzmuller, *et al.* Antimonial-mediated DNA fragmentation in Leishmania infantum amastigotes. Antimicrob Agents Chemother, v.45, n.7, Jul, p.2064-9. 2001.

Soares-Bezerra, R. José;, *et al.* Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos / Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracelular molecules as a drug target Rev. bras. cienc. farm, v.40 n.2, p.139-149. 2004.

Soto, J., L. Valda-Rodriquez, *et al.* Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, v.71, n.5, Nov, p.577-81. 2004.

Sudhandiran, G. e C. Shaha. Antimonial-induced increase in intracellular Ca2+ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular Leishmania donovani amastigotes. J Biol Chem, v.278, n.27, Jul 4, p.25120-32. 2003.

Sundar, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop Med Int Health, v.6, n.11, Nov, p.849-54. 2001.

Sundar, S. e M. Chatterjee. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. Indian J Med Res, v.123, n.3, Mar, p.345-52. 2006.

Sundar, S., P. R. Sinha, *et al.* A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. Am J Trop Med Hyg, v.59, n.1, Jul, p.139-43. 1998.

Tan, H. L., C. J. Hou, *et al.* Electrophysiologic mechanisms of the long QT interval syndromes and torsade de pointes. Ann Intern Med, v.122, n.9, May 1, p.701-14. 1995.

Thakur, C. P. Harmful effect of high stibogluconate treatment of kala-azar in India. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.80, n.4, p.672-3. 1986.

Thakur, C. P., M. Kumar, *et al.* Rationalisation of regimens of treatment of kala-azar with sodium stibogluconate in India: a randomised study. Br Med J (Clin Res Ed), v.296, n.6636, Jun 4, p.1557-61. 1988.

Thakur, C. P., G. P. Sinha, *et al.* Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases. Ann Trop Med Parasitol, v.92, n.5, Jul,

p.561-9. 1998.

Valladares, J. E., J. Alberola, *et al.* Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. Vet Rec, v.138, n.8, Feb 24, p.181-3. 1996.

Valladares, J. E., C. Riera, *et al.* Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with Leishmania infantum. Vet Parasitol, v.75, n.1, Feb 15, p.33-40. 1998.

Veeken, H., K. Ritmeijer, *et al.* A randomized comparison of branded sodium stibogluconate and generic sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis under field conditions in Sudan. Trop Med Int Health, v.5, n.5, May, p.312-7. 2000.

Veiga, J. P., R. Khanam, *et al.* Pentavalent antimonial nephrotoxicity in the rat. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.32, n.4, Jul-Aug, p.304-9. 1990.

Veiga, J. P., T. T. Rosa, *et al.* [Renal function in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimony compounds]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.27, n.6, Nov-Dec, p.298-302. 1985

Viguer, M. T. C., I. E. Erraztia, *et al.* Torsade de pointes durante el tratamiento de la leishmaniasis con antimoniato de meglumina. Rev Esp Cardiol v.52, n.7, p.533-535. 1999.

Weir, M. R. e V. J. Dzau. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. Am J Hypertens, v.12, n.12 Pt 3, Dec, p.205S-213S. 1999.

Wyllie, S., M. L. Cunningham, *et al.* Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen Leishmania donovani. J Biol Chem, v.279, n.38, Sep 17, p.39925-32. 2004.

VIII ANEXOS

8.1. Parâmetros bioquímicos

A- Tabelas de análises bioquímicas protocolo agudo

Tabela 10: Valores séricos de amilase após administração de 500 mg Sb/kg/dia VIV contido nos fármacos (n=8/grupo)

Grupo	Amilase X ± e.p.m
CONT	572,4 ± 181,7
AM	577,7 ± 150,0
AM 1	611,0 ± 60,08
GLUC	891,8*,A ± 58,47

*p<0.05 comparados com os animais do grupo controle que receberam administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni)

B-Tabelas de análises bioquímicas protocolo sub-agudo

Tabela 11: Valores séricos de amilase nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m	Tempo 7 X ± e.p.m	Tempo 15 X ± e.p.m	Tempo 30 X ± e.p.m
CONT.	354,8 ± 36,17	232,8 ± 34,97	378,0 ± 37,40	210,6 ± 47,45
AM	700,7* ± 58,87	559,5* ± 50,18	547,9 ± 34,66	671,0*,c ± 56,01
AM 1	629,2* ± 33,06	407,4b,c ± 18,44	1685,0*,a ± 155,40	1167*,c ± 164,7
GLUC	726,1* ± 83,02	521,9* ± 12,54	2208,0*,a ± 320,00	452,2 ± 33,74

* p<0.05 comparados com os animais do grupo que recebeu administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni).

Tabela 12: Valores séricos de AST nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m	Tempo 7 X ± e.p.m	Tempo 15 X ± e.p.m	Tempo 30 X ± e.p.m
CONT.	191,2 ± 14,74	203,8 ± 27,48	213,6 ± 10,12	155,7 ± 27,55
AM	257,2 ± 51,79	258,7 ± 29,73	149,5^{*,b,c} ± 9,22	199,9 ± 8,93
AM 1	214,5 ± 7,017	226,5 ± 22,86	293,6 ± 32,67	205,6 ± 27,33
GLUC	155,4 ± 22,14	171,7 ± 13,15	240,0 ± 26,38	423,2*^{,a} ± 22,45

p<0.05 comparados com os animais do grupo que receberam administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni).

Tabela 13: Valores séricos de ALT nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m	Tempo 7 X ± e.p.m	Tempo 15 X ± e.p.m	Tempo 30 X ± e.p.m
CONT.	96,6 ± 14,60	69,2 ± 8,12	96,1 ± 5,83	65,9 ± 4,37
AM	75,7 ± 15,66	53,9 ± 5,76	53,8^{*,c} ± 6,12	83,5 ± 5,59
AM 1	116,4 ± 4,92	105,1 ± 8,860	84,00 ± 5,523	73,12 ± 7,848
GLUC	98,3 ± 14,34	86,3 ± 7,52	96,9 ± 4,42	117,4 ± 20,16

p<0.05 comparados com os animais do grupo que receberam administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni).

Tabela 14: Valores séricos de fosfatase alcalina nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m	Tempo 7 X ± e.p.m	Tempo 15 X ± e.p.m	Tempo 30 X ± e.p.m
CONT	187,2 ± 17,56	156,3 ± 19,73	163,3 ± 9,08	183,2 ± 18,38
AM	234,8 ± 24,22	183,69 ± 12,7	231,8* ± 15,27	260,0*^{,b,c} ± 40,55

AM 1	193,8	±	14,15	173,5	±	8,42	192,8	±	19,59	202,7	±	8,86
GLUC	228,5	±	17,08	203,3	±	8,88	227,1*	±	19,86	149,3	±	16,98

p<0.05 comparados com os animais do grupo que receberam administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni).

Tabela 15: Valores de variação de potássio (%) excretado na urina em 24 horas nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m			Tempo 7 X ± e.p.m			Tempo 15 X ± e.p.m			Tempo 30 X ± e.p.m		
CONT	-12,6	±	3,12	-15,7	±	6,18	-9,6	±	5,86	-8,7	±	11,98
AM	21,5	±	13,84	24,1	±	17,05	60,9*	±	25,60	2,51	±	14,72
AM 1	45,0*	±	20,62	32,1	±	18,40	44,2*	±	12,92	41,5	±	24,20
GLUC	40,4*	±	24,99	53,6*	±	32,90	-2,0	±	11,93	-9,5	±	4,87

p<0.05 comparados com os animais do grupo que receberam administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni).

Tabela 16: Valores de variação de sódio (%) excretado na urina em 24 horas nos tempos 3, 7, 15 e 30 dias após administração VIP de 50 mg Sb/kg/dia contido nos fármacos

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m			Tempo 7 X ± e.p.m			Tempo 15 X ± e.p.m			Tempo 30 X ± e.p.m		
CONT.	4,3	±	4,75	6,0	±	8,34	-0,6	±	12,11	6,9	±	14,01
AM	31,2	±	12,45	37,7	±	17,78	163,8^{*,c}	±	22,48	76,9	±	29,63
AM 1	29,8	±	27,67	12,25	±	10,31	48,5	±	23,96	41,5	±	15,29
GLUC	-13,7	±	9,19	-14,2	±	12,28	32,3	±	17,05	8,9	±	13,40

p<0.05 comparados com os animais do grupo que receberam administração de PBS (Kruskal-wallis seguido pelo teste de Bonferroni).

8.2. Avaliação de sinais de ECG e PA

Tabela 17 – Média dos valores absolutos de freqüência cardíaca e parâmetros eletrocardiográficos avaliados, em diferentes tempos, após a administração VIP. de 50 mg Sb/kg/dia (n=8/grupo).

Parâmetros	Tempo (dias)		Controle	AM	AM 1	GLUC
PR (ms)	3	Antes	47,7 ± 1,33	40,6 ± 0,67	47,3 ± 1,88	44,3 ± 1,89
		Após	48,1 ± 1,36	43,5 ± 0,98	50,1 ± 1,16	53,5 ± 1,74
	7	Antes	47,7 ± 1,33	39,9 ± 1,14	47,7 ± 2,17	48,2 ± 1,27
		Após	47,9 ± 1,32	42,0 ± 0,95	54,6 ± 2,23	54,9 ± 1,91
	15	Antes	47,7 ± 1,33	37,6 ± 0,74	50,3 ± 4,53	45,6 ± 1,42
		Após	46,6 ± 1,31	41,9 ±0,44	53,9 ± 10,64	53,3 ± 3,68
	30	Antes	47,7 ± 1,33	37,9 ± 0,92	44,8 ± 6,49	46,1 ± 0,79
		Após	46,7 ± 1,17	41,3 ± 1,47	48,4 ± 7,08	52,9 ± 0,56
QRS (ms)	3	Antes	14,4 ± 0,37	30,5 ± 0,47	18,9 ± 3,21	22,6 ± 0,75
		Após	14,7 ± 0,27	34,3 ± 0,65	21,1 ± 3,58	24,4 ± 0,72
	7	Antes	14,4 ± 0,37	30,8 ± 1,12	23,6 ± 0,63	22,7 ± 1,03
		Após	14,6 ± 0,23	34,6 ± 1,09	24,7 ± 0,83	23,5 ± 0,36
	15	Antes	14,4 ± 0,37	31,3 ± 0,83	23,1 ± 0,61	21,5 ± 1,16
		Após	14,0 ± 0,37	35,1 ± 0,93	28,8* ± 3,44	23,5 ± 0,59
	30	Antes	14,4 ± 0,37	30,7 ± 0,66	22,1 ± 0,21	22,9 ± 0,66
		Após	13,9 ± 0,42	32,7 ± 1,01	22,8 ± 0,33	24,3 ± 1,07
QT (ms)	3	Antes	51,7 ± 1,02	70,8 ± 1,11	80,7 ± 1,32	82,9 ± 1,51
		Após	51,8 ± 1,35	87,2 ± 1,62	90,1 ± 3,30	90,8 ± 2,69
	7	Antes	51,7 ± 1,02	73,39 ± 1,06	84,0 ± 1,97	80,6 ± 1,61
		Após	50,9 ± 1,01	86,1 ± 1,77	103,2*± 4,48	86,1 ± 2,70
	15	Antes	51,7 ± 1,02	71,8 ± 0,71	92,2 ± 3,92	79,8 ± 1,52
		Após	50,7 ± 0,74	89,3* ± 4,09	115,1*± 9,07	87,2 ± 4,15
	30	Antes	51,7 ± 1,02	72,2 ± 2,34	85,8 ± 2,79	83,1 ± 0,33
		Após	50,8 ± 0,74	88,4*± 3,21	89,8 ± 2,31	89,4 ± 4,66
QTc (ms)	3	Antes	94,7 ± 2,16	131,0± 1,10	153,9 ± 3,69	158,4 ± 1,46

		Após	95,9 ± 2,69	161,8^{*,b,c}± 2,51	165,6 ± 3,36	160,7 ± 4,57
	7	Antes	94,7 ± 2,16	137,5 ± 1,89	157,4 ± 2,58	153,7 ± 2,38
		Após	94,4 ± 2,22	158,8*± 1,95	181,7* ± 5,93	162,1 ± 4,28
	15	Antes	94,7 ± 2,16	138,4 ± 1,56	166,9 ± 3,47	151,2 ± 3,14
		Após	95,5 ± 2,43	166,2*± 6,89	197,4 ± 8,98	161,4 ± 7,18
	30	Antes	94,7 ± 2,16	135,6 ± 2,86	157,3 ± 3,07	155,7 ± 2,66
		Após	96,9 ± 1,84	163,3^{*,b,c}± 4,90	165,9 ± 2,79	167,3 ± 6,47
	3	Após	79,4 ± 17,73	104,5 ± 2,66	103,8 ± 10,30	100,8 ± 15,38
PAS	7	Após	106,8 ± 4,74	111,2 ± 3,85	104,5 ± 4,91	111,0 ± 4,97
(mmHg)	15	Após	122,8 ± 4,49	119,8 ± 3,88	63,0^{*,a,c}± 9,21	102,6 ± 3,52
	30	Após	111,8 ± 1,99	115,1 ± 1,76	115,3 ± 3,14	102,2 ± 9,70
	3	Após	77,9 ± 1,94	76,2 ± 2,39	67,2 ± 15,67	72,3 ± 10,71
PAD	7	Após	80,1 ± 2,79	69,9 ± 3,41	82,9 ± 4,75	79,5 ± 3,22
(mmHg)	15	Após	87,2 ± 3,43	71,95 ± 2,79	47,4^{*,c} ± 7,56	80,8 ± 2,87
	30	Após	77,8 ± 1,06	70,3 ± 2,21	78,6 ±2,39	74,9 ± 10,35
	3	Antes	373 ± 11,8	383 ± 11,8	419 ± 19,0	419 ± 12,8
		Após	381 ± 15,2	385 ± 12,1	378 ± 22,5	361 ± 34,2
	7	Antes	373 ± 11,8	401 ± 10,4	396 ± 10,6	418 ± 11,9
FC		Após	382 ± 17,4	382 ± 13,9	335 ± 14,8	409 ± 7,8
(bpm)	15	Antes	373 ± 11,8	432 ± 10,3	364 ± 20,7	414 ± 15,3
		Após	401 ± 17,3	392*± 6,1	316 ± 25,0	389 ± 20,4
	30	Antes	373 ± 11,8	391 ± 11,7	374 ± 17,8	397 ± 17,3
		Após	417 ± 12,3	381 ± 8,3	380 ± 12,0	396 ± 14,7

Os valores representam a média dos valores absolutos ± erro padrão da média. Os dados antes e depois indicam os valores dos parâmetros analisados antes do início do tratamento e após a administração da substância teste, respectivamente. Para os valores de pressão, não há valores controle antes do início do tratamento e os valores estão representados como médias dos valores absolutos ± erro padrão da média.

8.3. Concentração sérica de Sb durante o tratamento sub-agudo

Tabela 18:Concentração de Sb no soro de ratos após 24 horas da administração do fármaco tratados com 50 mg SbV/kg/dia VIP por até 30 dias

Grupo	Tempo 3 X ± e.p.m	Tempo 7 X ± e.p.m	Tempo 15 X ± e.p.m	Tempo 30 X ± e.p.m
CONT.	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
AM	0,14 ± 0,032	0,13 ± 0,042	0,18* ± 0,047	0,27* ± 0,086
AM 1	0,12 ± 0,028	0,21* ± 0,033	0,13 ± 0,031	0,16* ± 0,025
GLUC	0,06 ± 0,011	0,13 ± 0,067	0,45*,b,c ± 0,050	0,44*,b ± 0,111

* diferença significativa entre os grupos que receberam antimoniais pentavalentes e salina tamponada b- diferença comparada ao grupo que recebe AM1 c-diferença comparada ao grupo que recebeu GLUC ($p<0.05$)

8.4. Representação das análises dos parâmetros cardiovasculares

A planilha abaixo ilustra os parâmetros cardiovasculares de um animal durante 60 minutos após administração da solução teste.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	Rato 1 SALINA (INÍCIO INJEÇÃO 16:20:44)																
2	QT	0,0675	0,0667	0,0658	0,0675	0,0658	0,0642	0,0675	0,0658	0,0692	0,0667						
3	PR	0,0525	0,0517	0,0517	0,0525	0,05	0,0533	0,0542	0,0517	0,0542	0,0517	0,0542					
4	QRS	0,0142	0,015	0,0142	0,015	0,0158	0,015	0,015	0,015	0,0142	0,015	0,0142					
5	RR	0,1908	0,1942	0,1933	0,1892	0,19	0,1875	0,1917	0,1908	0,1908	0,19						
6	PAS																
7	PAD																
8	QTc	0,117249	0,11518	0,113802	0,117579	0,114457	0,112168	0,117066	0,114297	0,120202	0,116022	#DIV/0!					
9	FC	314,4654	308,9598	310,3983	317,1247	315,7895	320	312,989	314,4654	314,4654	315,7895	#DIV/0!					
10																	
11	QT	0,0658	0,0658	0,0667	0,0683	0,0667	0,0667	0,0642	0,0667	0,0683	0,07						
12	PR	0,0517	0,0533	0,0525	0,0533	0,0525	0,05	0,0525	0,0533	0,0525	0,0525						
13	QRS	0,015	0,0142	0,0142	0,0142	0,0142	0,0158	0,015	0,0142	0,0142	0,015						
14	RR	0,1875	0,1908	0,1917	0,19	0,1892	0,19	0,1892	0,1908	0,1908	0,1917						
15	PAS																
16	PAD																
17	QTc	0,114963	0,114297	0,115678	0,118805	0,116186	0,116022	0,111831	0,11586	0,118639	0,121401	#DIV/0!					
18	FC	320	314,4654	312,989	315,7895	317,1247	315,7895	317,1247	314,4654	314,4654	312,989	#DIV/0!					
19																	
20	QT	0,0675	0,0642	0,0642	0,0675	0,0675	0,0633	0,0683	0,0658	0,0692	0,07						
21	PR	0,0508	0,0533	0,0533	0,0508	0,0542	0,0508	0,0533	0,0525	0,0525	0,0508	0,0508					
22	QRS	0,0142	0,015	0,0142	0,0142	0,015	0,0158	0,015	0,0142	0,0142	0,015						
23	RR	0,1867	0,1883	0,1908	0,1892	0,1883	0,1867	0,1892	0,1908	0,1925	0,1883						
24	PAS																
25	PAD																
26	QTc	0,118102	0,112009	0,111517	0,117579	0,117766	0,110753	0,118973	0,114297	0,119848	0,122128	#DIV/0!					
27	FC	321,3712	318,6405	314,4654	317,1247	318,6405	321,3712	317,1247	314,4654	311,6883	318,6405	#DIV/0!					
28																	
29	Média controle														Media		
30	QT	0,066933	0,065567	0,065567	0,067767	0,066667	0,064733	0,066667	0,0661	0,0689	0,0689				0,06678		
31	PR	0,051667	0,052767	0,0525	0,0522	0,052233	0,051367	0,053333	0,0525	0,053067	0,051667	0,0525			0,052345		
32	QRS	0,014467	0,014733	0,0142	0,014467	0,015	0,015533	0,015	0,014467	0,0142	0,015	0,0142			0,014661		
33	RR	0,188333	0,1911	0,191933	0,189467	0,189167	0,188067	0,190033	0,1908	0,191367	0,19				0,190027		
34	PAS	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!		
35	PAD	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!		
36	QTc	0,116771	0,113828	0,113666	0,117988	0,116136	0,112981	0,115956	0,114818	0,119563	0,119851				0,116156		
37	FC	318,6122	314,0219	312,6176	316,6796	317,1849	319,0536	315,7462	314,4654	313,5397	315,8063				315,7727		
38																	
39	1minuto após administração																
40															Media		variação
41	QT	0,0658	0,0683	0,0633	0,0658	0,0675	0,0658	0,0658	0,0667	0,0642	0,0667	0,0667			0,066055		-1,086335
42	PR	0,0517	0,0525	0,0542	0,055	0,0542	0,0533	0,0533	0,0525	0,0533	0,0542	0,0542			0,053491		2,18826
43	QRS	0,0142	0,0142	0,0142	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,0142			0,014709		0,330715
44	RR	0,1825	0,185	0,1867	0,1858	0,1838	0,1825	0,1825	0,1842	0,1867	0,1858				0,18455		-2,882052
45	PAS														#DIV/0!		#DIV/0!
46	PAD														#DIV/0!		#DIV/0!
47	QTc	0,116004	0,119866	0,110753	0,115313	0,118719	0,116004	0,116004	0,117227	0,112328	0,11689				0,115911		-0,210971
48	FC	328,7671	324,3243	321,3712	322,9279	326,4418	328,7671	328,7671	325,7329	321,3712	322,9279				325,1399		2,966408
49																	
50	2 minutos após administração																
51															média		variação
52	QT	0,0667	0,0683	0,0675	0,0642	0,0658	0,0683	0,0667	0,0658	0,0667	0,0683				0,06683		0,074873
53	PR	0,0517	0,0525	0,0517	0,0533	0,0533	0,0508	0,0525	0,0525	0,0542	0,0517	0,0508			0,052273		-0,138937
54	QRS	0,015	0,0142	0,0158	0,0142	0,015	0,0142	0,0158	0,0167	0,0158	0,0158	0,015			0,015227		3,865234
55	RR	0,1842	0,1808	0,1792	0,1775	0,1783	0,1808	0,1833	0,1825	0,18	0,18				0,18066		-4,929133
56	PAS														#DIV/0!		#DIV/0!
57	PAD														#DIV/0!		#DIV/0!
58	QTc	0,117227	0,120787	0,119727	0,114236	0,116907	0,120787	0,117419	0,116004	0,118132	0,120966				0,118219		1,77647
59	FC	325,7329	331,8584	334,8214	338,0282	336,5115	331,8584	327,3322	328,7671	333,3333	333,3333				332,1577		5,18884
60																	
61	3 minutos após admininstração																
62															média		variação
63	QT	0,0683	0,0658	0,0675	0,0683	0,0642	0,0675	0,0667	0,0675	0,0675	0,0667	0,0633	0,0683		0,0668		0,029949
64	PR	0,0533	0,0508	0,0533	0,0533	0,0525	0,0517	0,0525	0,0533	0,0542	0,0533	0,0525	0,0508		0,052625		0,53404
65	QRS	0,0142	0,015	0,015	0,0142	0,015	0,015	0,015	0,015	0,0158	0,0142	0,015	0,0167		0,015008		2,371848
66	RR	0,1775	0,1775	0,1783	0,1792	0,185	0,1825	0,1792	0,1783	0,1775	0,1792				0,17942		-5,581673
67	PAS														#DIV/0!		#DIV/0!
68	PAD														#DIV/0!		#DIV/0!
69	QTc	0,121531	0,117083	0,119928	0,121146	0,112671	0,119001	0,118308	0,119928	0,120108	0,118308				0,118801		2,277287
70	FC	338,0282	338,0282	336,5115	334,8214	324,3243	328,7671	334,8214	336,5115	338,0282	334,8214				334,4663		5,919948
71																	

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
72	4 minutos após administração															
73														média		variação
74	QT	0,0692	0,065	0,0667	0,0667	0,0683	0,065	0,0667	0,0667	0,0658	0,0667			0,06668		-0,149745
75	PR	0,0533	0,0517	0,0533	0,0533	0,0517	0,0533	0,0517	0,0542	0,055	0,0525	0,05		0,052727		0,72942
76	QRS	0,0142	0,015	0,0142	0,0133	0,0158	0,015	0,0158	0,015	0,0133	0,015	0,0167		0,014845		1,260852
77	RR	0,1808	0,1833	0,1792	0,1783	0,1775	0,1792	0,18	0,1833	0,1792	0,1792			0,18		-5,276452
78	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
79	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
80	QTc	0,122379	0,114426	0,118308	0,118506	0,121531	0,115292	0,118132	0,117419	0,116711	0,118308			0,118101		1,674936
81	FC	331,8584	327,3322	334,8214	336,5115	338,0282	334,8214	333,3333	327,3322	334,8214	334,8214			333,3682		5,572178
82																
83	5 minutos após administração															
84														média		variação
85	QT	0,0667	0,0658	0,065	0,0667	0,0683	0,0658	0,065	0,0675	0,0683	0,0633			0,06624		-0,808625
86	PR	0,0508	0,0517	0,0542	0,0525	0,0525	0,0542	0,0525	0,0517	0,0517	0,0517	0,0517		0,052291		-0,104203
87	QRS	0,015	0,0158	0,0167	0,015	0,0142	0,015	0,0142	0,015	0,015	0,0167	0,0158		0,015309		4,423315
88	RR	0,1767	0,1767	0,1808	0,1792	0,1775	0,1758	0,1767	0,1767	0,18	0,1783	0,1775		0,177809		-6,429401
89	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
90	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
91	QTc	0,118863	0,117259	0,114951	0,118308	0,121531	0,117459	0,115834	0,120289	0,120966	0,112466			0,117793		1,409096
92	FC	339,5586	339,5586	331,8584	334,8214	338,0282	341,2969	339,5586	339,5586	333,3333	336,5115	338,0282		337,4647		6,869499
93																
94	10 minutos após administração															
95														média		variação
96	QT	0,0675	0,0658	0,0658	0,0633	0,0675	0,0658	0,0667	0,065	0,0642	0,0675	0,0683		0,066127		-0,977429
97	PR	0,0558	0,0533	0,0542	0,0558	0,0542	0,0542	0,0558	0,0558	0,055	0,0558	0,055		0,054991		5,053838
98	QRS	0,015	0,015	0,015	0,0158	0,015	0,015	0,0158	0,0158	0,0158	0,015	0,0158		0,015364		4,79537
99	RR	0,1792	0,1808	0,185	0,185	0,18	0,1808	0,1817	0,1858	0,1825	0,18			0,18208		-4,181869
100	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
101	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
102	QTc	0,119727	0,116366	0,115479	0,111091	0,119549	0,116366	0,117763	0,113911	0,113183	0,119549			0,116298		0,122704
103	FC	334,8214	331,8584	324,3243	324,3243	333,3333	331,8584	330,2146	322,9279	328,7671	333,3333			329,5763		4,371365
104																
105	15 minutos após administração															
106														média		variação
107	QT	0,0667	0,0683	0,0683	0,0692	0,065	0,065	0,0675	0,0683	0,0675	0,0675			0,06733		0,8236
108	PR	0,055	0,055	0,0558	0,0558	0,0542	0,0533	0,055	0,0542	0,055	0,0542			0,05475		4,593609
109	QRS	0,0142	0,015	0,015	0,0158	0,0142	0,015	0,015	0,0158	0,0158	0,0158			0,01516		3,406366
110	RR	0,1917	0,19	0,1933	0,1933	0,1967	0,1967	0,1933	0,19	0,1933				0,193144		1,640705
111	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
112	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
113	QTc	0,115678	0,118805	0,118125	0,119682	0,111767	0,111767	0,116742	0,118805	0,116742				0,116457		0,259329
114	FC	312,989	315,7895	310,3983	310,3983	305,033	305,033	310,3983	315,7895	310,3983				310,6919		-1,609006
115																
116	20 minutos após administração															
117														média		variação
118	QT	0,065	0,0642	0,0667	0,0683	0,0658	0,0658	0,0683	0,0633	0,0675	0,0667			0,06616		-0,928422
119	PR	0,055	0,0592	0,0558	0,0567	0,0583	0,0567	0,0558	0,0567	0,055	0,0567			0,05659		8,108718
120	QRS	0,015	0,015	0,0158	0,015	0,0142	0,0167	0,0167	0,0142	0,0158	0,0167			0,01551		5,793716
121	RR	0,1958	0,19	0,1933	0,1967	0,1967	0,1967	0,1933	0,19	0,1967				0,194356		2,278043
122	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
123	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
124	QTc	0,111938	0,111674	0,115358	0,117441	0,113142	0,113142	0,118125	0,110108	0,116065				0,11411		-1,760941
125	FC	306,4351	315,7895	310,3983	305,033	305,033	305,033	310,3983	315,7895	305,033				308,7714		-2,217196
126																
127	25 minutos após administração															
128														média		variação
129	QT	0,0692	0,0675	0,0642	0,0667	0,0683	0,0667	0,07	0,0675	0,0692	0,0667			0,0676		1,227913
130	PR	0,0575	0,0575	0,0567	0,0567	0,0567	0,0575	0,0567	0,0567	0,055	0,0542			0,05652		7,974991
131	QRS	0,0158	0,015	0,0158	0,015	0,0167	0,0158	0,0167	0,015	0,0158	0,0158			0,01574		7,362547
132	RR	0,1933	0,1933	0,1933	0,1967	0,1933	0,1933	0,1933	0,19	0,1967				0,193689		1,927215
133	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
134	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
135	QTc	0,119682	0,116742	0,111034	0,11469	0,118125	0,115358	0,121066	0,117414	0,118988				0,117011		0,736291
136	FC	310,3983	310,3983	310,3983	305,033	310,3983	310,3983	310,3983	315,7895	305,033				309,8051		-1,889863
137																
138	30 minutos após administração															
139														média		variação
140	QT	0,065	0,0658	0,0658	0,0675	0,065	0,0675	0,0667	0,0658	0,0633	0,0675			0,06599		-1,182989
141	PR	0,0567	0,0567	0,0558	0,0567	0,0558	0,0558	0,0558	0,055	0,0567	0,0567			0,05617		7,306356
142	QRS	0,0158	0,0158	0,0167	0,0167	0,0183	0,0167	0,015	0,0167	0,0158	0,0167			0,01642		12,00083
143	RR	0,1883	0,1875	0,1883	0,19	0,19	0,1883	0,1875	0,1875	0,1892				0,188511		-0,797549
144	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
145	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
146	QTc	0,113404	0,114963	0,1148	0,117414	0,113065	0,117766	0,116536	0,114963	0,110263				0,114797		-1,169648
147	FC	318,6405	320	318,6405	315,7895	315,7895	318,6405	320	320	317,1247				318,2917		0,797705
148																
149	35 minutos após administração															
150														média		variação
151	QT	0,0683	0,0667	0,0675	0,0675	0,0675	0,0675	0,0683	0,0667	0,0642	0,0683			0,06725		0,703804
152	PR	0,0567	0,055	0,0542	0,0558	0,0558	0,0558	0,055	0,0567	0,0558	0,0567	0,0567		0,055836		6,668982
153	QRS	0,015	0,0158	0,0167	0,0158	0,015	0,0158	0,0158	0,015	0,0167	0,0167	0,0158		0,015827		7,957834
154	RR	0,1883	0,19	0,19	0,19	0,1883	0,1892	0,19	0,1925	0,1892	0,1883			0,18958		-0,235055
155	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
156	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
157	QTc	0,119162	0,116022	0,117414	0,117414	0,117766	0,117579	0,118805	0,115518	0,111831	0,119162			0,117067		0,784699
158	FC	318,6405	315,7895	315,7895	315,7895	318,6405	317,1247	315,7895	311,6883	317,1247	318,6405			316,5017		0,230852
159																

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
149	35 minutos após administração															
150														média		variação
151	QT	0,0683	0,0667	0,0675	0,0675	0,0675	0,0675	0,0683	0,0667	0,0642	0,0683			0,06725		0,703804
152	PR	0,0567	0,055	0,0542	0,0558	0,0558	0,0558	0,055	0,0567	0,0558	0,0567	0,0567		0,055836		6,668982
153	QRS	0,015	0,0158	0,0167	0,0158	0,015	0,0158	0,0158	0,015	0,0167	0,0167	0,0158		0,015827		7,957834
154	RR	0,1883	0,19	0,19	0,19	0,1883	0,1892	0,19	0,1925	0,1892	0,1883			0,18958		-0,235055
155	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
156	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
157	QTc	0,119162	0,116022	0,117414	0,117414	0,117766	0,117579	0,118805	0,115518	0,111831	0,119162			0,117067		0,784699
158	FC	318,6405	315,7895	315,7895	315,7895	318,6405	317,1247	315,7895	311,6883	317,1247	318,6405			316,5017		0,230852
159																
160	40 minutos após administração															
161														média		variação
162	QT	0,0675	0,0658	0,0658	0,063	0,0633	0,0658	0,0667	0,0667	0,0683	0,0675			0,06604		-1,108116
163	PR	0,0567	0,0575	0,0567	0,055	0,055	0,0567	0,0575	0,0575	0,0575	0,0575			0,05676		8,433484
164	QRS	0,015	0,0158	0,0167	0,0167	0,0167	0,015	0,0158	0,0158	0,0158	0,015			0,01583		7,976437
165	RR	0,1908	0,1892	0,19	0,19	0,19	0,1892	0,1892	0,19	0,19	0,19			0,18984		-0,098232
166	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
167	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
168	QTc	0,117249	0,114618	0,114457	0,109586	0,110108	0,114618	0,116186	0,116022	0,118805	0,117414			0,114906		-1,075694
169	FC	314,4654	317,1247	315,7895	315,7895	315,7895	317,1247	317,1247	315,7895	315,7895	315,7895			316,0576		0,090225
170																
171	45 minutos após administração															
172														média		variação
173	QT	0,0642	0,0683	0,0683	0,0675	0,0667	0,065	0,0683	0,0675	0,0633	0,0658			0,06649		-0,434262
174	PR	0,0558	0,0567	0,055	0,0558	0,0567	0,0558	0,0567	0,0575	0,0567	0,0567			0,05634		7,631122
175	QRS	0,0167	0,0142	0,0167	0,015	0,0167	0,015	0,0158	0,015	0,0167	0,0167			0,01585		8,112857
176	RR	0,19	0,1933	0,19	0,1933	0,1933	0,19	0,1933	0,1867	0,1933				0,191467		0,757788
177	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
178	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
179	QTc	0,111674	0,118125	0,118805	0,116742	0,115358	0,113065	0,118125	0,118102	0,109478				0,115497		-0,567027
180	FC	315,7895	310,3983	315,7895	310,3983	310,3983	315,7895	310,3983	321,3712	310,3983				313,4146		-0,746787
181																
182	50 minutos após administração															
183														média		variação
184	QT	0,0683	0,0667	0,0683	0,0683	0,0658	0,0683	0,0683	0,0683	0,0683	0,0683			0,06789		1,662174
185	PR	0,0567	0,0575	0,0575	0,0575	0,0583	0,0575	0,0583	0,0575	0,0583	0,0567			0,05758		10
186	QRS	0,015	0,0158	0,0167	0,0158	0,0158	0,0167	0,0167	0,0167	0,0167	0,0175			0,01634		11,45515
187	RR	0,1992	0,2	0,1967	0,2	0,2	0,2	0,1967	0,2	0,2				0,199178		4,815698
188	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
189	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
190	QTc	0,116947	0,114055	0,117441	0,116791	0,112516	0,116791	0,117441	0,116791	0,116791				0,116174		0,01571
191	FC	301,2048	300	305,033	300	300	300	305,033	300	300				301,2523		-4,598376
192																
193	55 minutos após administração															
194														média		variação
195	QT	0,0667	0,0642	0,0683	0,0675	0,0683	0,0667	0,0683	0,0683	0,0683				0,0674		0,928422
196	PR	0,06	0,0608	0,0583	0,0583	0,0575	0,06	0,0583	0,06	0,0583				0,059056		12,81888
197	QRS	0,015	0,015	0,0167	0,0167	0,0167	0,0158	0,0167	0,0167	0,0167				0,016222		10,65178
198	RR	0,2	0,21	0,21	0,2067	0,21	0,2067	0,21	0,21	0,21				0,208156		9,540181
199	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
200	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
201	QTc	0,114055	0,108009	0,114907	0,114163	0,114907	0,11281	0,114907	0,114907	0,114907				0,11373		-2,08808
202	FC	300	285,7143	285,7143	290,2758	285,7143	290,2758	285,7143	285,7143	285,7143				288,3152		-8,695333
203																
204	60 minutos após administração															
205														média		variação
206	QT	0,0692	0,0667	0,0675	0,0658	0,0683	0,0667	0,0683	0,0658	0,0683				0,0674		0,928422
207	PR	0,0633	0,0642	0,0642	0,0625	0,0642	0,0633	0,0642	0,0642	0,0633				0,063711		21,71279
208	QRS	0,0158	0,0158	0,0167	0,0175	0,0167	0,0167	0,0158	0,0167	0,0175				0,016578		13,07703
209	RR	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,2267	0,22	0,22					0,220838		16,21395
210	PAS													#DIV/0!		#DIV/0!
211	PAD													#DIV/0!		#DIV/0!
212	QTc	0,11463	0,110489	0,111814	0,108998	0,113139	0,109389	0,113139	0,108998					0,111325		-4,159265
213	FC	272,7273	272,7273	272,7273	272,7273	272,7273	264,667	272,7273	272,7273					271,7197		-13,95086