

## Comunicação

[Communication]

### **Enalapril e captopril revertem o edema e a hiperplasia renais causados pelo antimoniato de N-metilglucamina em camundongos C57BL/6**

[*Enalapril and captopril reverse edema and renal hyperplasia caused by N-methylglucamine antimonate in C57BL/6 mice*]

S.S. Oliveira<sup>1</sup>, L.L. Lopes<sup>2</sup>, A.S. Damazo<sup>3</sup>, D. Albuquerque<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Univag/Indea – Cuiabá, MT

<sup>2</sup>Hovet – Universidade Federal de Mato Grosso – Cuiabá, MT

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Mato Grosso – Cuiabá, MT

No Brasil e nos demais países de língua portuguesa, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), um antimonial pentavalente (Sb<sup>+5</sup>), é a droga de primeira linha para o tratamento das leishmanioses (Manual..., 2014). As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que podem ocorrer na pele, nas membranas mucosas ou nas vísceras. Embora o antimoniato de N-metilglucamina tenha sido introduzido em 1945 e ainda seja a droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (Frézard e Demicheli, 2010), o índice de sucesso terapêutico, usando o esquema preconizado pelo Ministério da Saúde, varia de 26% a 91,4% (Lima *et al.*, 2007). Além disso, o uso de antimoniato de N-metilglucamina está associado a efeitos adversos, como, artralgia, cefaleia, reações cutâneas, mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas, cardiológicas e renais (Rodrigues *et al.*, 2007). No que tange aos efeitos adversos do antimoniato de N-metilglucamina, postula-se que a cardiotoxicidade seria o seu efeito adverso mais severo. Todavia, a literatura mostra que os efeitos tóxicos do antimoniato de N-metilglucamina sobre os rins podem ser severos, levando inclusive os pacientes a óbito (Amato *et al.*, 1998). A elevada toxicidade e as variações no índice de sucesso terapêutico tornam o tratamento das leishmanioses com antimoniato de N-metilglucamina um desafio para o sistema único de saúde (SUS), inclusive com aumento de custos para os cofres públicos e geração de sofrimento para o paciente. Assim, as

adversidades decorrentes do uso do antimoniato de N-metilglucamina têm impulsionado a realização de pesquisas na perspectiva de se obter um cenário mais promissor. Entre as alternativas terapêuticas de se reverter ou amenizar a cardiotoxicidade e a renotoxicidade do antimoniato de N-metilglucamina, sobressaem-se os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), como o captopril e o enalapril. Nesse sentido, foi verificado, em um estudo retrospectivo, que a administração concomitante de antimoniato de N-metilglucamina e inibidores da ECA, entre eles o captopril e o enalapril, parece corrigir a cardiotoxicidade causada pelo antimoniato de N-metilglucamina (Rodrigues *et al.*, 2007). Já está bem estabelecido que o enalapril e o captopril, além de serem anti-hipertensivos, são também anti-inflamatórios e imunorreguladores (Cavanagh *et al.*, 1995). Em um trabalho anterior, mostrou-se que o captopril reduz a nefrite no modelo murino BW[F1], predisposto ao desenvolvimento de lúpus (Albuquerque *et al.*, 2004). Embora antimoniato de N-metilglucamina seja tóxico para os rins de humanos (Sampaio *et al.*, 1997) e de ratos (Veiga *et al.*, 1990), não há registros na literatura de estudos pré-clínicos avaliando o efeito do captopril ou enalapril sobre as lesões renais causadas pelo antimoniato de N-metilglucamina em camundongos. Portanto, no presente estudo, avaliou-se o possível efeito do captopril e do enalapril sobre os efeitos do antimoniato de N-metilglucamina em rins de camundongos e verificou-se que tanto o enalapril quanto o captopril revertem o edema e a hiperplasia renais causados pelo antimoniato de N-metilglucamina.

Recebido em 10 de dezembro de 2015

Aceito em 4 de março de 2016

E-mail: suizeoli@hotmail.com

Animais: os camundongos da linhagem C57BL/6, isogênicos, usados neste experimento, eram todos fêmeas, estavam com idade de 12 semanas no início do experimento, e foram adquiridos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Salvador, BA. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com acesso livre a água e ração autoclavadas, com ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas e temperatura a 25°C. A manipulação dos animais foi feita de acordo com os princípios de ética da experimentação animal (# 23108.039341/12-4). Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, com 10 animais por grupo, como segue: grupo 1: recebeu salina a 0,9% por via intramuscular por 30 dias, e os animais foram deixados sem outro tratamento, servindo de controle; grupo 2: recebeu antimoniato de N-metilglucamina (100mg Sb<sup>+5</sup>/kg) por via intramuscular; grupo 3: recebeu antimoniato de N-metilglucamina como o grupo 2 e foi tratado com captopril; grupo 4: recebeu o antimoniato de N-metilglucamina como o grupo 2 e foi tratado com enalapril.

Medicamentos e tratamento: o captopril (Captotec®) e o enalapril (Enaprotec®) foram obtidos comercialmente (Hexal Laboratoty, São Paulo, SP, Brasil). O captopril e o enalapril foram dissolvidos em água potável autoclavada, na concentração de 0,12 mg/mL para o captopril e de 0,02 mg/mL para o enalapril. Os medicamentos, dissolvidos em água potável, foram oferecidos *ad libitum*, e a dosagem diária foi de 30mg/kg de peso corporal para o captopril e de 5mg/kg para o enalapril, assumindo-se uma ingestão diária de 5mL de água por animal. A dose do captopril foi previamente estabelecida para manter a pressão arterial normal (Albuquerque *et al.*, 2004). Já a dose do enalapril está dentro das margens das doses desse medicamento normalmente usado para o tratamento oral de camundongos (Albuquerque *et al.*, 2004/10). Além disso, a administração desses medicamentos por via oral e oferecidos *ad libitum*, está bem estabelecida na literatura pertinente (Albuquerque *et al.*, 2010). Os medicamentos dissolvidos em água potável autoclavada foram repostos a cada 24 horas, e o tratamento foi realizado durante um mês, sem interrupção. O antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®; Sanofi-Aventis, São Paulo, SP, Brasil) foi cedido pela professora Dra. Márcia

Hueb, do Hospital Universitário Júlio Müller, da UFMT. Cada ampola de 5mL Glucantime® continha 1,5g de antimoniato bruto, o equivalente a 405mg de antimônio pentavalente (Sb<sup>+5</sup>) ou 81mg/mL de Sb<sup>+5</sup>. A dose do antimoniato de N-metilglucamina usado neste trabalho está descrita na literatura pertinente (Santos, 2008).

Análise histopatológica: após 30 dias de tratamento, os camundongos foram sacrificados de forma assistida por uma médica veterinária (CRMV-MT 1698), e, imediatamente após, foram coletados os rins. Em seguida, os rins foram imersos em formalina a 10%, tamponada com fosfato durante 24h. Os tecidos foram processados e incluídos histologicamente em parafina, seccionados em 5µm de espessura, acondicionados em lâminas de vidro e corados por hematoxilina e eosina (HE) para a análise em microscópio de luz.

Análise estatística: os resultados foram tratados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas (GraphPad Prism 5 for Windows). O nível de significância foi de P≤0,05 e os resultados foram expressos como a média±desvio-padrão.

Os resultados expressos na Tab. 1 e na Fig. 1 mostram que os rins dos animais tratados com antimoniato de N-metilglucamina apresentavam edema, hiperplasia nucleolar dos podócitos e hiperplasia nucleolar das células epiteliais nos túbulos contorcidos proximais. Os resultados também mostram que o enalapril reverteu completamente o edema e a hiperplasia nucleolar dos podócitos das células epiteliais nos túbulos contorcidos proximais causados pelo antimoniato de N-metilglucamina (Tab. 1 e Fig. 1). Por outro lado, os animais que receberam antimoniato de N-metilglucamina e foram tratados com captopril ainda apresentavam um pequeno edema renal comparados ao controle (Tab. 1 e Fig. 1). Os mecanismos pelos quais o enalapril e o captopril revertem as lesões renais causadas pelo antimoniato de N-metilglucamina não foram estudados no presente trabalho. Entretanto, pode-se especular que esses medicamentos podem ter inibido a síntese de biomoléculas inflamatórias, já que eles são reconhecidamente drogas anti-inflamatórias.

Tabela 1. Análise histológica dos rins de camundongos C57BL/6 injetados, por via intramuscular, com salina a 0,9% ou antimoniato de N-metilglucamina e tratados ou não com enalapril ou captopril, durante 30 dias

Alterações histopatológicas	Salina	AM	AM+CP	AM+EP
Edema	0,1 ± 0,1	3,5 ± 0,17***	0,8 ± 0,13###	0,8 ± 0,13###
Hiperplasia <sup>1</sup>	0,1 ± 0,1	3,4 ± 0,16***	0,6 ± 0,16###	0,6 ± 0,16###
Hiperplasia <sup>2</sup>	0,1 ± 0,1	3,3 ± 0,15***	0,7 ± 0,15###	0,7 ± 0,15###

<sup>1</sup>Hiperplasia nucleolar dos podócitos; <sup>2</sup>hiperplasia nucleolar das células epiteliais nos túbulos contorcidos proximais. \*\*\*, P<0,01 para antimoniato de N-metilglucamina *versus* controle; ###, P<0,01 para antimoniato de N-metilglucamina *versus* captopril ou enalapril. AM, antimoniato de N-metilglucamina; CP, captopril; EP, enalapril.

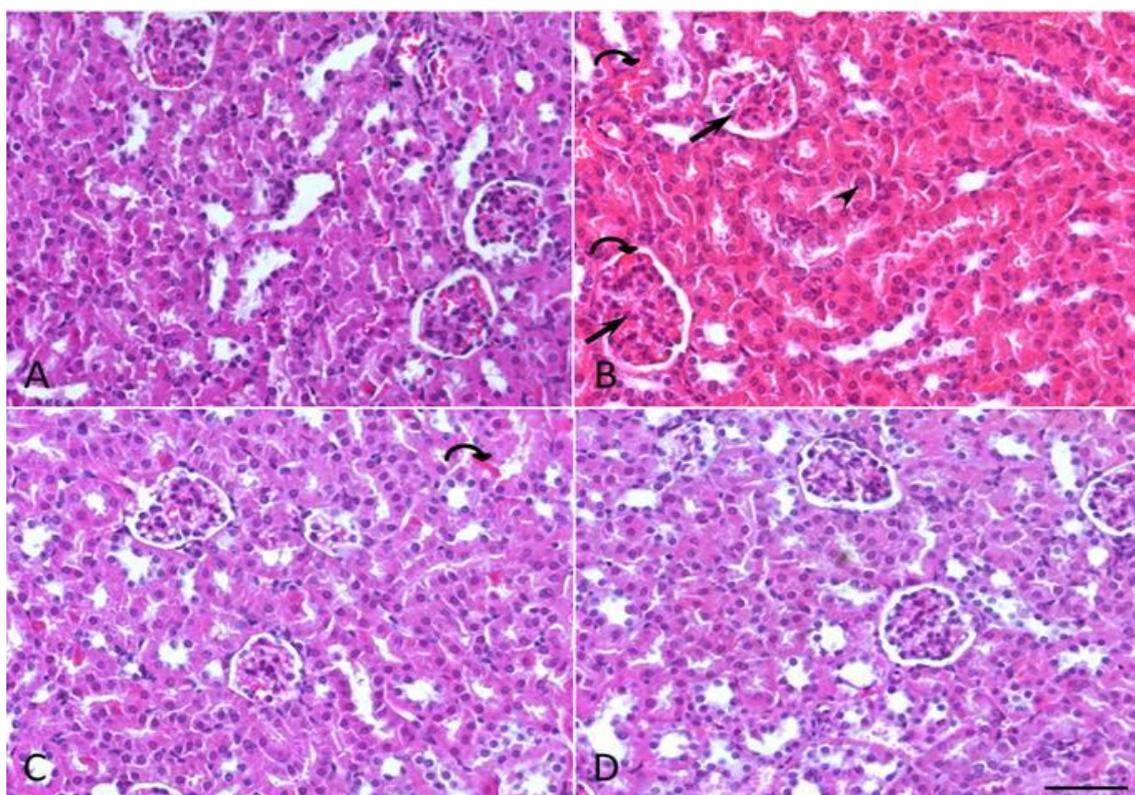


Figura 1. Análise histopatológica dos rins de camundongos C57BL/6.

No final do experimento, os animais foram sacrificados, e biopsias dos rins foram analisadas. (A) grupo controle evidenciando morfologia normal da região cortical do rim. (B) grupo tratado com antimoniato de N-metilglucamina apresentando hiperplasia nuclear dos podócitos (setas) e das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais (cabeças de setas) e edema (seta curva). (C) grupo tratado com antimoniato de N-metilglucamina e captopril evidenciando pequeno edema (seta curva). (D) grupo tratado com antimoniato de N-

metilglucamina e enalapril evidenciando morfologia normal. Coloração HE. Barra = 100µm.

Com base nos resultados, pode-se concluir que o enalapril e o captopril reverterem o edema e a hiperplasia causados pelo antimoniato de N-metilglucamina em camundongos C57BL/6.

Palavras-chave: inibidores da enzima conversora de angiotensina, glucantime, renototoxicidade

## ABSTRACT

The aim of this study was to verify whether enalapril and captopril would reverse the renal damage caused by N-methylglucamine antimoniate in C57BL/6 mice. We used inbred C57BL/6 female mice, obtained from the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, BA. The mice were divided into four groups as follows: Group 1: received saline by the intramuscular (IM) route; Group 2: received N-methylglucamine antimoniate (IM); Group 3: received N-methylglucamine antimoniate and captopril; Group 4: was treated with N-methylglucamine antimoniate and enalapril. Both enalapril and captopril were orally administered in drinking water (*ad libitum*). After 30 days of treatment, the animals were sacrificed and their kidneys were collected for histological analysis which showed that enalapril completely reversed the edema, the podocytes hyperplasia and nucleus of the epithelial cells in the proximal convoluted tubules caused by N-methylglucamine antimoniate. On the other hand, the captopril treatment partially inhibited kidney harmful effects caused by N-methylglucamine antimoniate. Taken together, we would conclude that enalapril and captopril reverse edema and renal hyperplasia caused by N-methylglucamine antimoniate in mice.

Keywords: enzyme-converting inhibitors, glaucantime, renotoxicidade

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia – CNPq (# 471234/2011-7).

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, D.; NIHEI, J.; CARDILLO, F.; SINGH, R. The ACE inhibitors enalapril and captopril modulate cytokine responses in Balb/c and C57Bl/6 normal mice and increase CD4+CD103+CD25negative splenic T cell numbers. *Cellular Immunol.*, v.260, p.92-97, 2010.

ALBUQUERQUE, D.A.; SAXENA, V.; ADAMS, D.E. *et al.* An ACE inhibitor reduces Th2 cytokines and TGF-beta1 and TGF-beta2 isoforms in murine lupus nephritis. *Kidney Intern.*, v.65, p.846-859, 2004.

AMATO, V.S.; OLIVEIRA, L.S.; SILVA, A.C.M. Um caso de leishmaniose cutâneo-mucosa tratado com sucesso com baixa dose de antimonial pentavalente. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.31, p.221-224, 1998.

CAVANAGH, E.M.V.; INSERRA, F.; FERDER, L. *et al.* Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. *FEBS Lett.*, v.361, p.22-24, 1995.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin Drug Delivery*, v.7, p.1343-1358, 2010.

LIMA, E.B.; MOTTA, J.O.C.; PORTO, C.; SAMPAIO, R.N.R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *An. Bras. Dermatol.*, v.82, p.111-124, 2007.

MANUAL de VIGILÂNCIA e CONTROLE da LEISHMANIOSE VISCERAL. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 122p.

RODRIGUES, A.M.; HUEB, M.; NERY, A.F.; FONTES, C.J.F. Possible cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors during treatment of American tegumentar leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Acta Trop.*, v.102, p.113-118, 2007.

SAMPAIO, R.N.R.; PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, J.H.D. *et al.* Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do antimonial pentavalente administrado na dose de 40mg sbv/kg/dia, de 12/12h, por 30 dias na forma cutâneo-mucosa de leishmaniose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, p.457-463, 1997.

SANTOS, M.R.; KRIGNL, C.J.; NAVA, A. *et al.* Avaliação do efeito cumulativo do antimoniate de meglumina sobre a prole de camundongos swiss: ensaio biológico. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.54, p.13-16, 2008.

VEIGA, J.P.R.; KHANAM, R.; ROSA, T.T.; JUNQUEIRA JR, L.F. *et al.* Pentavalent antimonial nephrotoxicity in the rat. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.32, p.304-309, 1990.