

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

DIANA BITTENCOURT BENTO

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS TRATADOS AGUDAMENTE COM ANTIOMONIATO DE
MEGLUMINA

CRICIÚMA (SC), JANEIRO DE 2009.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DIANA BITTENCOURT BENTO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS TRATADOS AGUDAMENTE COM ANTIOMONIATO DE
MEGLUMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres

Romão

CRICIÚMA (SC), DEZEMBRO DE 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B478a Bento, Diana Bittencourt.
Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em camundongos tratados agudamente com antiomoniato de meglumina / Diana Bittencourt Bento; orientador: Pedro Roosevelt Torres Romão. – Criciúma : Ed. do autor, 2009.
73 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2009.

1. Leishmaniose - Tratamento. 2. Imunologia. 3.

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 364/14^a -
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
 Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
 Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
 Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentado pela candidata **DIANA BITENCOURT BENTO** sob o título “Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em camundongos tratados agudamente com antiomoniato de meglumina” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

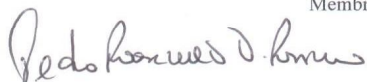
Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.


Criciúma, SC, 15 de janeiro de 2009.


Prof. Dr. Marcos Marques da Silva paula
 Membro Relator


Profa Dra Gabriele Cordenonzi Ghisleni
 Membro Externo


Profa Dra Alexandra Ioppi Zugno
 Membro Interno


Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão
 Orientador


Prof. Dr. João Luciano de Quevedo
 Coordenador do PPGCS

Dedico este trabalho aos meus pais Ana Maria e Nilton, que sempre acreditaram em mim, e me deram apoio, força e coragem para prosseguir e completar mais esta etapa de minha vida. E com seus princípios morais me fizeram ser quem eu sou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, por ter me permitido nascer numa família maravilhosa, e por todas as oportunidades.

Agradeço aos meus pais Ana Maria e Nilton que acreditaram no meu sonho e não mediram esforços para me ajudar nessa conquista. Sempre me apoiando, incentivando e mostrando a importância do conhecimento e de todo o esforço.

Ao meu pai que sempre me mostrou que este era o caminho que teria de ser vencido com muito êxito, por todo o apoio e confiança em mim depositada. A minha mãe, um exemplo de garra, esforço, superação, sempre mostrando que os obstáculos são para serem superados. Agradeço-a pelo companheirismo, força, compreensão, carinho e amor. Aos dois que me deram à vida e todos os princípios que trago comigo.

Ao meu irmão Fabiano que onde quiser que esteja, sei que estará feliz com mais essa conquista... com ele aprendi que a vida é somente uma passagem, e cabe somente a nós vivermos da melhor forma.

Ao meu irmão Júnior, pela ajuda nas digitações, compreensão e por todo sentido que devolveu à nossa vida.

Ao Eduardo, pelo entendimento nas minhas ausências e estresses; pela força e compreensão. Pelo silêncio que muitas vezes falaram mais que muitas palavras, por ser essa pessoa tão maravilhosa na minha vida.

As minhas colegas de mestrado Ana Carla e Shirley, pela troca de experiência e amizade que fizemos.

Ao meu orientador Professor Dr. Pedro, sou infinitamente agradecida por ter acreditado em mim, pela sua competência, paciência, ética, e excelente orientação e ajuda para com o trabalho desenvolvido.

Agradeço a Patrícia em nome da FioreFarma e ao Marcos Ricardo em nome da MdcPharma por terem aceitado minhas ausências em dias de mestrado.

Meu profundo agradecimento a ela, que foi a incentivadora desse sonho e que acreditou em mim, minha querida e inesquecível professora Dayani Gallato.

As estagiárias do laboratório, Bruninha e Amanda pela força nos experimentos, a Fabrícia e ao Prof. Felipe Dal-Pizzol

Enfim, agradeço aqueles que direta ou indiretamente, estiveram juntos nessa caminhada, e que de alguma forma contribuíram para a concretização desse sonho.

Obrigado a todos.

RESUMO

Apesar do uso clínico de antimoniais pentavalentes no tratamento das leishmanioses a mais de meio século, seus mecanismos da ação e toxicidade permanecem pouco compreendidos. Tem sido sugerido que o estresse oxidativo pode contribuir com a progressão da leishmaniose cutânea humana. No presente estudo, para compreender melhor o mecanismo de toxicidade do antimônio pentavalente (Sb^{5+}), investigou-se o efeito da administração aguda do antimoniato de meglumina (20, 60 ou 120mg Sb^{5+} /Kg/dia – subcutaneamente durante três dias) sobre o estresse oxidativo em camundongos não infectados. A peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas foram avaliados como indicativo de dano oxidativo, e as enzimas superóxido dismutase e catalase para indicar a condição antioxidante. Observou-se que a administração aguda de Sb^{5+} causou significativa carbonilação de proteína no coração, baço e cérebro, e igualmente peroxidação de lipídios no fígado e no cérebro dos animais tratados com Sb^{5+} . O desequilíbrio entre a atividade da SOD e da CAT foi verificado no coração, baço, cérebro e fígado dos animais tratados. Estes resultados demonstram pela primeira vez que o antimoniato do meglumina induz estresse oxidativo em diversos órgãos de animais não infectados, sugerindo que a produção de espécies reativas derivadas do oxigênio e/ou nitrogênio induzidas diretamente pelo antimônio pode levar ao estresse oxidativo, e também estar envolvido com alguns dos efeitos adversos tóxicos do Sb^{5+} .

Palavras-chave: Peroxidação lipídica; Carbonilação de proteínas; Antioxidantes; Leishmaniose; Antimoniato de meglumina; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Despite the clinical use of pentavalent antimonials for more than half a century for Leishmaniasis, their mechanisms of action and toxicity remain poorly understood. It has been suggested that oxidative stress may contribute to the progression of human cutaneous leishmaniasis. In the present study, to better understand the mechanism of host toxicity of pentavalent antimony, we investigated the effect of acute administration of meglumine antimoniate (20, 60 or 120 mg Sb^V/kg/day – subcutaneous during three days) on oxidative stress in uninfected mice. Lipid peroxidation and protein carbonylation were measured as an indicator for the oxidative status, and superoxide dismutase and catalase to indicate the antioxidative status. We observed that the acute administration of Sb^V caused significant protein carbonylation in the heart, spleen and brain, and also lipid peroxidation in the liver and brain of Sb^V treated animals. Furthermore, the imbalance between SOD and CAT activities was verified in heart (SOD decreased), spleen (SOD increased), brain (SOD and CAT decreased) and liver (CAT decreased). Our results demonstrated for the first time that meglumine antimoniate induces oxidative stress in several organs of uninfected animals, suggesting that the production of oxygen and/or nitrogen derived reactive species induced directly by drug could lead to oxidative stress and also may be involved with some of toxic adverse effects of antileishmanial pentavalent antimony.

Key words: Lipid Peroxidation; Protein Carbonyls; Antioxidants; Meglumine Antimoniate, Oxidative Stress; Leishmaniasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT – Catalase

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione forma reduzida

GSSG – Glutathione forma oxidada

RL – Radicais livres

Sb³⁺ – Antimônio trivalente

Sb⁵⁺ – Antimônio pentavalente

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Epidemiologia.....	10
1.2 Ciclo de vida do parasito e Síndromes clínicas.....	10
1.3 Mecanismos de controle imunológico da infecção.....	13
1.4 Radicais livres.....	14
1.5 Defesas antioxidantes.....	17
1.6 Estratégias de tratamento.....	19
1.7 Compostos de Antimônio.....	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 RESULTADOS	24
4 ARTIGO	26
Oxidative stress and enzymatic antioxidative status in mice treated with antileishmanial meglumine antimoniate.....	26
5 DISCUSSÃO	49
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As Leishmanioses são zoonoses amplamente distribuídas em países tropicais e subtropicais, e prevalentes em cinco continentes (África, Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul). São consideradas endêmicas em 88 países e reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde como as mais sérias doenças infecto-parasitárias, com uma incidência anual de dois milhões de novos casos, e uma prevalência mundial de doze milhões de indivíduos (WHO, 2006).

1.2 Ciclo de vida do parasito e Síndromes clínicas

As leishmanias são responsáveis por um grupo de doenças cujos sintomas variam de lesão cutânea, em muitos casos autocicatrizantes, a infecções viscerais frequentemente fatais se não tratadas adequadamente.

O gênero *Leishmania* possui um ciclo de vida do tipo heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados, e insetos vetores. No tubo digestivo de vetores invertebrados (insetos) são encontradas as formas promastigotas infectantes (formas alongadas e com flagelos), enquanto em hospedeiros vertebrados (mamíferos) são encontradas as formas amastigotas (arredondadas e sem flagelo aparente) no interior de células como macrófagos (Muller & Baker, 1990; Titus et al., 1994), células de Langerhans (Blank et al., 1993), neutrófilos e eosinófilos (Grimaldi et al., 1984, Oliveira et al., 1998).

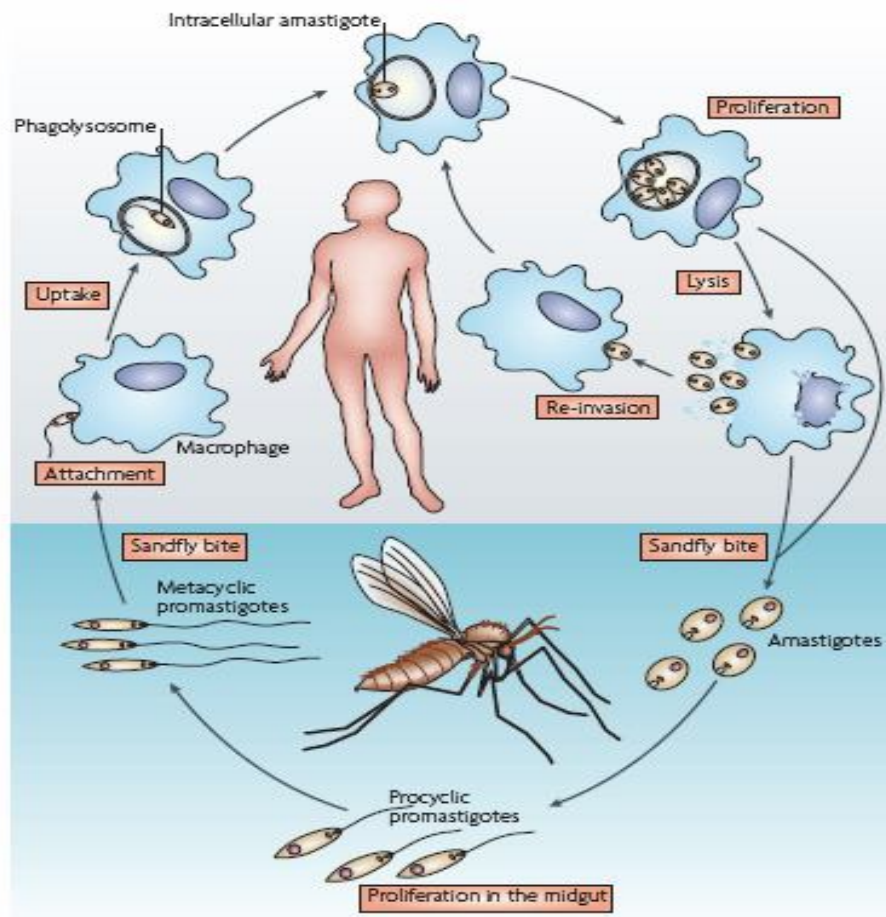


Figura 1 – Ciclo de vida do parasita (Chappuis, 2007)

Ao picar um hospedeiro vertebrado infectado, no momento do repasto sangüíneo, a fêmea do vetor ingere células parasitadas com formas amastigotas contidas no tecido do hospedeiro vertebrado. No intestino do vetor, as células se rompem e as formas amastigotas liberadas se diferenciam em formas promastigotas, as quais serão transmitidas para um hospedeiro mamífero não infectado. A medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, as células infectadas são lisadas e as formas amastigotas liberadas a fim de parasitar novas células (Chang et al., 1990). Embora a infecção inicial possa não resultar em sintomas clínicos, o parasitismo intracelular pode persistir num curso crônico localizado ou difundido para tecidos mucocutâneos ou órgãos viscerais resultando na doença propriamente dita.

Em termos imunológicos, a doença crônica pode estar associada à exacerbação ou a completa anergia da resposta imune do hospedeiro, resultando assim na incapacidade do hospedeiro em controlar a infecção (Foli et al., 1995).

No novo mundo (Américas) as leishmanias são transmitidas ao homem geralmente por fêmeas do gênero *Lutzomyia*. No velho mundo (Europa, África e Ásia) estes vetores pertencem ao gênero *Phlebotomus* (Desjeux, 1996). No Novo Mundo, a Leishmaniose pode ser dividida em dois grupos principais: Leishmaniose Visceral Americana (LVA) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Grimaldi & Tesh, 1993). Esta última inclui a forma cutânea (LC), mucocutânea (LM) e cutânea difusa (LCD). A LVA é geralmente causada por *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*), embora, ocasionalmente, *L. amazonensis* tenha sido isolada de pacientes com a forma visceral da doença (Barral et al., 1991). Do mesmo modo, *L. chagasi* tem sido associada a manifestações cutâneas com ausência de envolvimento visceral (Oliveira Neto et al., 1986). Em contraste, LTA é geralmente causada por espécies pertencentes aos complexos de *L. braziliensis* ou *L. mexicana*. Porém, alguns casos de LTA no Brasil (Momen et al., 1985), Equador e Venezuela (Hashiguchi et al., 1991) têm sido associados a um parasito similar a *L. major* do Velho Mundo. A LC (forma ulcerativa, autocicatrizante) tem sido associada com todas as espécies dermatotrópicas do Novo Mundo. Em contraste, a LCD (forma não ulcerativa, progressiva, anérgica) tem sido observada somente com espécies do complexo de *L. mexicana*. A forma LM (ulcerativa invasiva hiperérgica) é mais freqüentemente associada com *L. braziliensis* (Grimaldi et al., 1989), mas *L. panamensis* (Saravia et al., 1985), *L. guyanensis* (Santrich et al., 1990), e membros de *L. mexicana* (Barral et al., 1991) podem causar formas mutilantes da doença. Estima-se que em todo o

mundo ocorram dois milhões de novos casos de LTA a cada ano e que 10% da população mundial estejam sob risco de infecção (Roberts et al., 2000).

1.3 Mecanismos de controle imunológico da infecção

As diferentes manifestações clínicas da doença dependem de complexas interações entre as diferentes espécies de *Leishmania* e o sistema imune do hospedeiro infectado. Desse modo, fatores inerentes ao parasita (espécie, quantidade no inóculo, etc.), ao vetor (gênero, componentes das glândulas salivares, etc.) e ao hospedeiro (idade, padrão genético, estado nutricional, condições imunológicas, etc.) determinarão o curso de infecção (Malla & Mahajan, 2006; Romão et al., 2006; Monteiro et al., 2007).

Os fatores determinantes de virulência de *Leishmania* representam uma área de intensa pesquisa, onde a complexidade e redundância do sistema imune tornam difícil a compreensão temporal dos eventos celulares e interativos que podem estar propiciando a cura ou disseminação da infecção. No modelo de infecção experimental utilizando *L. major*, a resistência de determinadas linhagens de camundongos, como o C57BL/6, está associada à indução de uma resposta de linfócitos T auxiliar do tipo I (Th1), dependente principalmente da produção de interferon-gama (IFN- γ) e óxido nítrico (NO) (Scott, 1991; Heinzl et al., 1993). Contrariamente, a susceptibilidade de algumas linhagens de camundongos está relacionada ao desenvolvimento de uma resposta imune dependente de citocinas como interleucina-4 (IL-4), IL-10 e IL-13, determinando um perfil de resposta do tipo Th2 (Mohrs et al., 1999, Himmelrich et al., 2000).

O controle da infecção causada por *Leishmania* depende não só do tipo de resposta imune desenvolvida no hospedeiro infectado, mas também de fatores que são determinantes para a virulência dos parasitos como sua capacidade de seqüestrar e neutralizar intermediários reativos derivados do oxigênio e nitrogênio e ainda a aquisição de resistência a Sb^{5+} (Miller et al., 2000; Gantt et al., 2001).

A capacidade das formas amastigotas de *Leishmania* sobreviver ao estresse oxidativo gerado imediatamente e horas após o processo de fagocitose (Gantt et al., 2001) depende também de fatores intrínsecos aos parasitas. Neste contexto, foi demonstrado que os sistemas antioxidantes baseados em glutathiona (GSH) e tripanotiona/tripanotiona redutase $[T(SH)_2/TrpR]$ representam componentes protetores essenciais contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Dumas et al., 1997; Tovar et al., 1998, Romão et al., 1999; Romão et al., 2006) gerados durante a resposta imune.

Durante a fagocitose o macrófago produz uma resposta oxidativa contra a *Leishmania* intracelular, gerando superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico ($NO\cdot$) (Miller et al., 2000; Gantt et al., 2001). No primeiro estágio da infecção o superóxido é produzido como parte da explosão respiratória de macrófagos em resposta a fagocitose. A produção de superóxido é catalisada pela NADPH oxidase, que transfere um elétron de NADPH ao oxigênio, produzindo o superóxido. O outro oxidante produzido pelo macrófago que atua contra a *Leishmania* é o óxido nítrico, gerado após a ativação do macrófago por interferon- γ ($IFN-\gamma$) e pelo fator de necrose tumoral- α ($TNF-\alpha$). Tem sido demonstrado que o $NO\cdot$ é a principal molécula envolvida na morte intracelular do parasita (Gantt et al., 2001).

1.4 Radicais livres

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (Halliwell & Gutteridge, 1989). Os radicais livres cujo elétron não-emparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) respectivamente (Barreiros et al., 2006). A presença de elétrons desemparelhados na última camada, é que confere alta reatividade as espécies químicas. O organismo sofre ação constante de ERO e ERN gerados em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica (Ferreira et al., 1997).

As principais EROs dividem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{OH}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e os não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso. Já entre as ERN encontram-se o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos ($\text{N}_2\text{O}\cdot^-$), nitratos ($\text{N}_3\text{O}\cdot^-$) e peroxinitritos ($\text{ONOO}\cdot$). Alguns dessas espécies podem ser altamente reativos no organismo, enquanto que outras são poucos reativas, mas mesmo assim podem gerar dano (Barreiros et al., 2006).

Os radicais livres estão envolvidos em diversas atividades biológicas como a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, o excesso de radicais livres ocasiona reações com os substratos biológicos, tal como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas, enzimas, carboidratos e DNA podendo causar sérios danos à saúde humana. Dessa forma,

estão relacionados com diversas patologias, como por exemplo, a esclerose múltipla, isquemia, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer (Mates et al., 1999; Kock et al., 2007). Com relação às leishmanioses não está definido se o estresse oxidativo participa diretamente na geração inicial dos danos ou age simplesmente como fator agravante do quadro geral (Serarslan et al., 2005).

O radical $\text{OH}\cdot$ é a espécie mais reativa, sendo dificilmente seqüestrado *in vivo* (Ferreira et al., 1997, Barreiros et al., 2006), pois se combina muito rapidamente com metais ou outros radicais no próprio sitio onde foi gerado (Ferreira et al., 1997). Este radical é formado no organismo principalmente por reações do H_2O_2 com metais de transição. O $\text{OH}\cdot$ pode causar danos ao DNA, RNA, as proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocôndria (Barreiros et al., 2006).

O H_2O_2 é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. Entretanto, tem papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o $\text{OH}\cdot$ (Ferreira et al., 1997, Barreiros et al., 2006). O H_2O_2 oxida somente proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, GSH, por exemplo. O H_2O_2 é gerado *in vivo* por dismutação do ânion $\text{O}_2^{\cdot -}$ por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importantes fontes de $\text{O}_2^{\cdot -}$ e, como este ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em SOD que o converte em H_2O_2 . O H_2O_2 gerado é então parcialmente eliminado por antioxidantes como a CAT e glutathione peroxidase, mas como essa eliminação tem baixa eficiência, grande parte do H_2O_2 é liberado para a célula.

O $\text{O}_2^{\cdot -}$ auxilia na produção de radical $\text{HO}\cdot$, pela redução de Fe^{+3} , formando Fe^{+2} ; reage com o radical $\text{HO}\cdot$ produzindo oxigênio singlete e com o NO gerando $\text{ONOO}\cdot$. O ânion superóxido presente no organismo é eliminado pela enzima SOD,

que catalisa a dismutação de duas moléculas de O_2^- em O_2 e H_2O_2 . O H_2O_2 quando não eliminado do organismo pelas enzimas peroxidases e catalases, pode gerar OH^\cdot (Barreiros et al., 2006). Apesar dos efeitos danosos, o radical O_2^- é vital para as células de defesa e sem ele o organismo ficaria desprotegido contra infecções causadas por vírus bactérias e fungos. O radical O_2^- ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (Ferreira et al., 1997; Barreiros et al., 2006).

O NO^\cdot pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir da arginina, O_2 e NADPH, gerando NO e citrulina. O NO^\cdot não é suficientemente reativo para atacar diretamente DNA, mas pode reagir com o O_2^- , produzido pelos fagócitos, gerando $ONOO^-$, esse sim sofre reações secundárias tornando-o capaz de atacar o DNA (Barreiros et al., 2006).

1.5 Defesas antioxidantes

O excesso de radicais livres é neutralizado por antioxidantes. As proteções antioxidantes contra as ERO e ERN abrangem a proteção enzimática ou por macromoléculas, que podem ter origem no próprio organismo ou são adquiridas através da dieta. As macromoléculas representadas pelas enzimas podem atuar diretamente contra ERO e ERN ou, ainda, reparar os danos causados ao organismo por essas espécies, a exemplo: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). São conhecidos três sistemas principais antioxidantes. O primeiro é composto por duas enzimas SOD, uma que contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centro redox e ocorre no citosol (Ferreira et al., 1997; Mates et al., 1999; Barreiros et al., 2006), sendo que não sofre ação do

estresse oxidativo na sua atividade e outra que contém Mn^{2+} como centro redox, presente na mitocôndria (Ferreira et al., 1997; Barreiros et al., 2006) e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo. Estas enzimas catalisam a destruição do ânion O_2^- , convertendo-o em oxigênio e H_2O_2 (Ferreira et al., 1997; Barreiros et al., 2006).

O segundo sistema é formado pela CAT que atua na dismutação do H_2O_2 em O_2 e H_2O (Ferreira et al., 1997; Mates et al., 1999; Barreiros et al., 2006).

O terceiro sistema é formado pelo antioxidante glutathiona (GSH) em conjunto com as outras duas enzimas GPx e GR. A presença do selênio na enzima explica a importância desse metal e sua atuação como antioxidante nos organismos vivos. Esse sistema também catalisa a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo que a GSH atua em ciclos entre sua forma oxidada (GSSG) e sua forma reduzida (GSH). A GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença de GPx, formando uma ponte dissulfeto e em seguida, a GSSG é regenerada pela GR (Ferreira et al., 1997; Mates et al., 1999; Barreiros et al., 2006).

Apesar de essas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROs, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente, levando assim ao estresse oxidativo. Algumas situações geradoras do estresse oxidativo incluem: ativação de fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) por microorganismos, hiperóxia, alguns xenobióticos, radiação ionizante, isquemia (Yu, 1994). As EROs produzidas por estas células quando ativadas por microorganismos patogênicos atuam como moléculas microbicidas sendo, portanto, um importante meio de proteção contra o desenvolvimento de infecções. Portanto, a manutenção das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas em equilíbrio dinâmico com a formação de EROs no organismo é fundamental para a sua sobrevivência.

1.6 Estratégias de tratamento

Atualmente, apesar de inúmeros alvos moleculares de vital importância para a sobrevivência de *Leishmania* como, por exemplo, o sistema [T(SH)₂/TryR] terem sido identificados, não existe vacina eficaz contra leishmaniose e os fármacos de primeira escolha continuam sendo metalóides pertencentes ao grupo XV da tabela periódica, como o antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio. Estes fármacos pertencem ao grupo químico dos metais pesados, e embora possuam relativa eficácia na cura clínica da doença, seus efeitos deletérios podem ser graves. Efeitos adversos como mialgia, artralgia, anorexia, náuseas, vômitos e leucopenia podem ocorrer agudamente, enquanto a cardio, nefro e hepatotoxicidade, além de alterações pancreáticas podem estabelecer-se mais tardiamente, podendo ocasionar o óbito do paciente (Malla & Mahajan, 2006).

Dados da literatura indicam que a eficácia do antimoniato de meglumina no controle da forma cutânea da infecção varia de 26 a 100% (Rodrigues et al., 2006). Amfotericina B (Molina et al., 2007), pentoxifilina (Bafica et al., 2003, Machado et al., 2007), miltefosina (Bhattacharya et al., 2007) e outros fármacos vêm sendo utilizados em casos de resistência aos antimoniais. A resistência aos antimoniais tem sido relacionada a fatores como: aumento da expressão de genes relacionados à síntese de GSH e tripanotona e conjugação do antimônio trivalente (Sb³⁺) a tióis, seguido de efluxo (Mukhopadhyay et al., 1996; Grondin et al., 1997; Carter et al., 2003; Wyllie et al., 2004; Singh & Sivakumar, 2004; Singh N, 2006; Hadighi et al., 2006). Baixas dosagens e tratamento descontínuo levam a falhas na terapia e conseqüente aumento das formas resistentes do parasita (Rath et al., 2003).

A posologia recomendada pelo Ministério da saúde de é de 20mg/Sb⁵⁺/Kg/dia de 30 a 40 dias para o tratamento leishmaniose visceral e de 15mg/Sb⁵⁺/Kg/dia por 20 dias para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana (Brasil, 2003).

1.7 Compostos de Antimônio

Compostos de antimônio já eram empregados séculos antes da era Cristã para diversos fins terapêuticos. Somente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna observou que o Sb³⁺ era eficaz na terapêutica da LTA. Anos mais tarde foi comprovado também a eficácia deste metalóide para o tratamento do Calazar (Berman et al., 1980; Berman, 1988).

Devido aos graves efeitos colaterais e tóxicos, os Sb³⁺ foram substituídos por Sb⁵⁺. Esses últimos são derivados do ácido antimônio e da N-metil-glucamina, que por sua vez é obtida previamente a partir da aminação redutora de glicose em presença de metilamina. É um composto de fórmula estrutural não definida, solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos (Berman et al., 1980; Berman, 1988).

O antimoniato de meglumina no Brasil é o medicamento de primeira escolha na terapêutica da leishmaniose. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como a esterilização do parasita (Raht et al., 2003).

Pela ocorrência de diversos casos que não corresponderam aos esquemas descontínuos ou seriados de antimoniais, buscou-se aplicá-los em esquemas ininterruptos (Marsden et al., 1985), mesmo apresentando toxicidade, efeitos colaterais e alto custo (Korolkovas et al., 1988).

Pouco se compreende sobre o mecanismo de ação desta droga e sugere-se que o Sb^{5+} possa ser uma pró-droga, sendo convertido a Sb^{3+} após a administração, e assim possa interferir no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular. Vários estudos indicam que a formação in vivo do Sb^{3+} é responsável tanto pela atividade terapêutica como pela toxicidade do antimônio (Berman et al., 1980; Berman., 1988)

Há poucos estudos sobre aspectos toxicológicos e metabolização do antimônio. Sabe-se que em geral o antimônio acumula-se em órgãos vascularizados e tecidos, principalmente rim e fígado, além de possuir grande afinidade pelo baço e pelo sangue. Uma quantidade expressiva de antimônio no sangue pode estar relacionada com a alta afinidade do Sb^{3+} pelos eritrócitos (Felicetti et al., 1974).

O metabolismo do antimônio está relacionado com a mudança de valência após incorporação no organismo vivo, aproximadamente de 5-10%. No homem, assim como em roedores, apenas uma pequena quantidade de Sb^{5+} é reduzida para a forma trivalente. Parece que o organismo não possui mecanismos eficientes de detoxificação do Sb^{3+} (Chulay et al., 1988). A excreção de Sb^{3+} e Sb^{5+} em humanos é preferencialmente via renal. Verificou-se que mais de 80% do Sb^{3+} administrado intravenosamente como estibogluconato é excretado na urina após 6-8 h (Rees et al., 1980). A farmacocinética de compostos de Sb^{5+} (estibogluconato e antimoniato de meglumina), após aplicação intramuscular, é representada por uma fase inicial de absorção com tempo de meia vida de 0,85 h, seguida de uma fase de eliminação rápida com tempo de meia vida de 2,02 h e, por último, uma fase de eliminação com tempo médio de meia vida de 76 h (Chulay et al., 1988).

Há evidências de que o Sb^{5+} , tal como estibogluconato de sódio induz a ativação das células do hospedeiro e conseqüente morte dos parasitos intracelulares

(Ibrahim et al., 1994). Além disso, verificou-se que o estibogluconato de sódio age sinergicamente com interferon-alfa (IFN- α) na ativação do fator de transcrição STAT1 (transdutores de sinais e ativadores de transcrição) desencadeando a morte de linhagens de células tumorais como WM9 (melanoma), SW620 (carcinoma de colon) e U266 (mioeloma múltiplo) (Yi et al., 2002). Foi demonstrado que em macrófagos infectados com *Leishmania* o estibogluconato de sódio induz a produção de ERO através da via de sinalização PI3K-PKC-Ras/Raf, e morte dos parasitas intracelulares de modo dependente de NO através da ativação de PI3K e p38 MAPK (Basu et al., 2006). Tem sido sugerido que em leishmaniose cutânea humana, o estresse oxidativo pode contribuir para à progressão da doença. Neste contexto, alguns estudos mostraram que o sistema antioxidante está alterado durante a infecção (Kocyigit et al., 1998; Erel et al., 1999; Kocyigit et al., 2003; Serarslan et al., 2004; Vural et al., 2004; Kocyigit et al., 2005). Os autores sugeriram que na leishmaniose cutânea, a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio conduz ao estresse oxidativo devido à atividade enzimática alterada da SOD e da glutationala peroxidase (Serarslan et al., 2004; Vural et al., 2004). Embora a exposição ao antimônio possa produzir graves reações adversas, particularmente afetando coração, fígado e rim, pouco se conhece sobre seus mecanismos citotóxicos. Dessa forma, no presente estudo, para compreender melhor o mecanismo de toxicidade do Sb^{5+} , investigou-se o possível efeito do tratamento com antimoniato de meglumina sobre o estresse oxidativo em camundongos não infectados tratados com antimoniato de meglumina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento agudo com antimoniato de meglumina, sobre parâmetros de estresse oxidativo em camundongos não infectados com *leishmania*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar o efeito do tratamento agudo com antimônio de meglumina sobre a peroxidação de lipídios e carbonilação de proteínas no coração, fígado, rim, baço e cérebro de camundongos não infectados;
- ✓ Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no coração, fígado, rim, baço e cérebro de camundongos tratados agudamente com antimoniato de meglumina.

3 RESULTADOS

Apesar de sua alta toxicidade, o antimônio de meglumina continua sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento das várias formas clínicas da leishmaniose humana. Neste estudo avaliou-se o efeito do tratamento com antimoniato de meglumina sobre parâmetros de estresse oxidativo, uma vez que pouco se conhece sobre os mecanismos tóxicos deste fármaco.

Entre as reações adversas mais graves destacam-se aquelas relacionadas aos efeitos do antimônio sobre órgãos como coração, fígado e rim. Neste estudo, verificou-se que o tratamento agudo de camundongos não infectados com antimoniato de meglumina nas doses de 20, 60 e 120 mg/Kg não promoveu dano a lipídios no tecido cardíaco dos animais (Figura 1, painel A). Porém na dose de 120 mg/kg, Sb^{+5} foi capaz de promover carbonilação de proteínas (Figura 1, painel B). Neste tecido, a administração de antimoniato de meglumina em todas as doses testadas reduziu significativamente a atividade da enzima SOD (Figura 1, painel C), sem promover nenhuma alteração na atividade da catalase (Figura 1, painel D).

Em contraste para o observado no coração, o tratamento com Sb^{+5} aumentou significativamente o dano a lipídios no fígado (Figura 2, painel A). Com relação a carbonilação de proteínas, não se observou diferença significativa entre os grupos tratados e controles (Figura 2, painel B). Neste tecido, a SOD não sofreu alteração em sua atividade em nenhuma das doses de antimoniato de meglumina utilizadas (Figura 2, painel C). Já a atividade enzimática da catalase foi drasticamente reduzida no fígado dos animais tratados com as diferentes doses do antimoniato de meglumina (Figura 2, painel D).

No rim, ao contrário do verificado com os demais órgãos avaliados, ocorreu diminuição do dano a lipídios nos animais tratados com o antimoníato de meglumina em todas doses utilizadas. (Figura 3, painel A). Já a carbonilação de proteínas ocorreu somente na dose de 20 mg/kg (Figura 3, painel B). Com relação as defesas enzimáticas antioxidantes observou-se uma redução significativa da atividade da SOD apenas nos animais tratados com a dose de 20 mg/kg de antimoníato de meglumina (Figura 3, painel C), sem alteração da atividade da CAT em nenhuma das doses testadas (Figura 3, painel D).

No baço verificou-se dano a lipídios somente na dose de 60 mg/kg (Figura 4, painel A). Já a carbonilação de proteínas foi significativamente aumentada nos animais tratados com diferentes doses de Sb^{+5} (20, 60 e 120 mg/Kg) (Figura 4, painel B). Neste tecido observou-se um aumento significativo da atividade da SOD nos animais tratados com as diferentes doses (Figura 4, painel C). Assim como o verificado em relação ao coração e rim, nenhuma alteração significativa na atividade da CAT foi observada nos animais tratados com as doses utilizadas (Figura 4, painel D).

Em camundongos tratados agudamente com o antimoníato de meglumina também se observou dano cerebral. As diferentes doses (20, 60 e 120 mg/kg) de antimoníato de meglumina promoveram significativo dano a lipídios (Figura 5, painel A), enquanto que as doses de 60 e 120 mg/Kg causaram carbonilação de proteínas (Figura 5, painel B). Com relação as enzimas com função antioxidante, observou-se uma redução significativa na atividade da SOD no cérebro dos animais tratados com o antimoníato de meglumina nas doses de 20 e 60 mg/Kg (Figura 5, painel C). As três doses utilizadas reduziram significativamente a atividade da CAT (Figura 5, painel D).

4 ARTIGO

Oxidative stress and enzymatic antioxidative status in mice treated with antileishmanial meglumine antimoniate

Diana B. Bento^a, Bruna de Souza^b, Amanda V. Steckert^b, Fabricia C. Petronilho^b, Priscila Tavares^a, Renata O. Dias^a, Vanessa M. de Andrade^a, Susana E. Moreno^c, Felipe Dal-Pizzol^b and Pedro R. T. Romão^{a*}

^a*Laboratório de Imunologia e Mutagênese, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil;*

^b*Laboratório de Fisiopatologia, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil;*

^c*Laboratório de Inflamação, Universidade Católica Dom Bosco, Av. Tamandaré 6000, Jd. Seminário - CEP 79117-900, Campo Grande, MS, Brazil*

***Corresponding author:**

Laboratório de Imunologia e Mutagênese, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense

Av. Universitária, 1105 - Bairro Universitário - C.P. 3167

CEP: 88806-000 - Criciúma – SC, Brazil.

Phone: 55-48-3431-2758

Fax: 55-48-3431-2736

E-mail: ptr@unesc.net

Abstract

Despite the clinical use of pentavalent antimonials for more than half a century for Leishmaniasis, their mechanisms of action and toxicity remain poorly understood. It has been suggested that oxidative stress may contribute to the progression of human cutaneous leishmaniasis. In the present study, to better understand the mechanism of host toxicity of pentavalent antimony, we investigated the effect of acute administration of meglumine antimoniate (20, 60 or 120 mg Sb^V/kg/day – subcutaneously during three days) on oxidative stress in uninfected mice. Lipid peroxidation and protein carbonylation were measured as an indicator for the oxidative status, and superoxide dismutase and catalase to indicate the antioxidative status. We observed that the acute administration of Sb^V caused significant protein carbonylation in the heart, spleen and brain, and also lipid peroxidation in the liver and brain of Sb^V treated animals. Furthermore, the imbalance between SOD and CAT activities was verified in heart, spleen, brain and liver. Our results demonstrated for the first time that meglumine antimoniate induces oxidative stress in several organs of uninfected animals, suggesting that the production of nitrogen or oxygen derived reactive species induced directly by drug could lead to oxidative stress and also may be involved with some of toxic adverse effects of antileishmanial pentavalent antimony.

Key words: Lipid Peroxidation; Protein Carbonyls; Catalase; Superoxide Dismutase; Meglumine Antimoniate; Oxidative Stress

Abbreviations: ROS, Reactive oxygen species; Sb^V, pentavalent antimony; CAT, Catalase; SOD, Superoxide dismutase

Introduction

Leishmaniasis remains a major public health problem today in despite of the vast amount of research conducted on *Leishmania* pathogens. *Leishmania* cause a spectrum of diseases ranging from self-healing ulcers to disseminated and often fatal infections, depending on the species involved and the host's immune response. Adequate vaccines against leishmaniasis have yet to be developed, and drugs currently available for chemotherapeutic intervention are mostly unsatisfactory mainly because of their lack of specificity, toxicity to humans, and, in many cases, developed parasite resistance (Molyneux, 1997).

Currently, the first-choice of treatment remains the pentavalent antimonials (Sb^{V}), mainly meglumine antimoniate, which is obtained from the reaction between the antimony oxide V (Sb_2O_5) and N-methylglucamine, and their chemical structure was not fully determined (Roberts et al., 1998). In humans, the treatment is often limited because of toxic adverse effects including urticaria, nausea, lethargy, arthralgia, abdominal pain, pancreatitis, nephrotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity (Davidson, 1998; Guerin et al., 2002).

Pentavalent antimony (Sb^{V}) is regarded as a pro-drug that has to be transformed to the trivalent form (Sb^{III}) to kill the intracellular parasites. Reduction could either occur inside the parasites (Shaked-Mishan et al., 2001), or in the macrophage by derived thiols (Ferreira et al., 2003). It was demonstrated that Sb^{III} induces *Leishmania* death by an apoptotic-like mechanism involving DNA fragmentation and externalization of phosphatidylserine independently of caspase (Serenio et al., 2001; Sudhandiran and Shara, 2003). In leishmanias, trypanothione plays a central role in parasite protection against mammalian host defense systems by recycling trypanothione disulphide by the enzyme trypanothione reductase. Wyllie and colleagues (2004) have demonstrated that in *Leishmania* trivalent antimony interferes with trypanothione metabolism, inducing rapid efflux of intracellular trypanothione and glutathione. In this context, we have demonstrated that trypanothione and also glutathione are essential antioxidant systems that protect macrophages and parasites against the toxic effect of nitrogen-derived reactive species (Romão et al., 2006).

There is some evidence that pentavalent antimony such sodium antimony gluconate (SAG) induces host cell activation as an integral and necessary

component of SAG-induced antileishmanial effects *in vitro* (Ibrahim et al., 1994). Previous study indicates that SAG synergizes with alpha interferon (IFN- α), activating STAT1 to kill human cancer cell lines (Yi et al., 2002). In addition, SAG induces activation of intracellular signaling pathway in *Leishmania*-infected macrophages, which results in the production of reactive oxygen species (ROS) via PI3K-PKC-Ras/Raf pathway, and NO-dependent parasite killing (PI3K and p38 MAPK) (Basu et al., 2006). It has been suggested that oxidative stress may contribute to the progression of human cutaneous leishmaniasis. In this context, there are some reports showing that endogenous antioxidant functions are altered during infection (Kocyigit et al., 1998; Erel et al., 1999; Kocyigit et al., 2003; Vural et al., 2004; Kocyigit et al., 2005; Serarslan et al., 2005). The authors suggested that during cutaneous leishmaniasis the production of nitrogen (RNS) or oxygen reactive species (ROS) results in oxidative stress due to altered serum enzymatic activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase (Vural et al., 2004; Serarslan et al., 2005). On the other hand, exposure to antimony can produce cellular and organic injury, particularly in the heart, lung, liver and kidney but the exact mechanisms of action are not well understood (Leonard and Gerber, 1996). In the present study, to better understand the mechanism of host toxicity of pentavalent antimony, we investigated the ability of meglumine antimoniate treatment to induce oxidative stress in uninfected mice.

Materials and Methods

Animals

Male CF-1 mice (2 months, 30 g) were obtained from our breeding colony (UNESC). The animals were housed six per cage with food and water available *adlibitum* and were maintained on a 12-h light/ dark cycle (lights on at 7:00 am). All experimental procedures were performed in accordance with NIH Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals. This study was approved by the local ethics committee (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense).

Administration of meglumine antimoniate

Six mice per group received daily subcutaneous injections of meglumine antimoniate (Glucantime® - Aventis Pharma Brazil 81 mg Sb^V/ml) at doses of 20, 60 or 120 mg

Sb^V/kg/day during three days. The pentavalent antimony was dissolved in glucose solution 5% and used immediately. The control group received a solution consisting of glucose 5%. Drug solutions were prepared daily just before the administration. Twenty-four hours later, the animals were killed by decapitation and heart, brain, liver, kidney and spleen from each mouse were isolated and stored at -80 °C for posterior analyses.

Biochemical assays

Lipoperoxidation

The formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction was measured as an index of lipid peroxidation as previously described (Draper and Hadley, 1990). Briefly, samples of homogenate tissues (brain, heart, liver, kidney and spleen) obtained from control and meglumine antimoniate-treated mice were mixed with 1 ml of trichloroacetic acid 10% and 1 ml of thiobarbituric acid 0.67% and then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm. Results are expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (nmol/mg of protein).

Protein Carbonyls

The oxidative damage to proteins was assessed in tissue homogenates by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine as previously described (Levine et al., 1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in dinitrophenylhydrazine and the absorbance read at 370 nm

Protein estimation

Protein was estimated in all the fractions according to the method of Lowry et al. (1951). Bovine serum albumin was used as standard.

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities

In order to determine CAT activity, the tissue was sonicated in 50 mM phosphate buffer and the resulting suspension was centrifuged at 3000 g for 10 min. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity was measured by the rate of

decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm (Aebi, 1984). SOD activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described (Bannister and Calabrese, 1987).

Statistical analysis

Data are reported as means \pm standard deviation. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test when F was significant. $P < 0.05$ was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science software (SPSS, Chicado, IL).

Results

In order to determine oxidative stress induced by meglumine antimoniate *in vivo*, we have evaluated TBARS, protein carbonyl as indicative of damage and enzymatic antioxidant balance in the heart, brain, liver, kidney and spleen of mice acutely exposed to meglumine antimoniate (MA) at doses of 20, 60 and 120 mg Sb^V/kg/day.

We observed that the acute administration of Sb^V at doses of 20, 60 and 120 mg/kg/day did not increase lipid peroxidation in the mouse heart compared to control (Fig.1A). However, Sb^V at dose of 120 mg/kg caused a significant increase in carbonylated proteins (Fig. 1B). We found that all doses of Sb^V used cause significant decrease in SOD activity (Fig. 1C), while no changes in CAT activity were observed (Fig. 1D).

In contrast to observed in the heart, the injection of Sb^V at doses of 20, 60 or 120 mg/kg increased significantly lipid peroxidation in liver tissue (Fig. 2A). The administration of pentavalent antimony did not increase protein carbonyl formation in the liver (Fig. 2B). In this tissue, no changes in SOD activity were observed after the treatment with any dose tested (Fig. 2C). However, the CAT activity was significantly decreased at all doses used (Fig. 2D).

By contrast, when mice were treated with different doses of Sb^V (20, 60 or 120 mg/kg), all groups displayed a statistical significant reduction of kidney lipid peroxidation compared to control (Fig. 3A). However, the carbonylated protein was increased only in animals treated with 20 mg/kg of antileishmanial drug (Fig. 3B). The administration of Sb^V only at the lower dose decreased SOD activity in the kidney

(Fig. 3C). No changes in CAT activity were observed in kidney of Sb^{V} -treated mice (Fig. 3D).

Regarding the spleen, increased lipid peroxidation was observed only when animals were treated with Sb^{V} at the dose of 60 mg/kg (Fig. 4A). Carbonylated proteins were found increased in animals that received Sb^{V} at all doses used (Fig. 4B). In relation to protective antioxidant enzymes, the treatments increased SOD activity in the spleen (Fig. 4C). No changes in CAT activity were observed in spleen of Sb^{V} -treated mice, likely to what was described in the heart and kidney of antimony-treated animals (Fig. 4D).

In the brain, the injection of Sb^{V} at doses of 20, 60 and 120 mg/kg promoted lipid peroxidation (Fig. 5A), while at doses of 60 and 120 mg/kg increased the amount of carbonylated proteins compared to control animals (Fig. 5B). Concerning antioxidant enzymes, Sb^{V} at doses of 20 and 60 mg/Kg promoted a potent inhibition in brain SOD activity (Fig. 5C). As we had observed in the liver (Fig. 2D), the CAT activity was significantly decreased at all doses used (Fig. 5D).

Discussion

Our results demonstrated for the first time that meglumine antimoniate, under our experimental conditions, was able to induce oxidative stress in several organs of uninfected mice, suggesting that the production of nitrogen (RNS) or oxygen reactive species (ROS) induced directly by drug could lead to oxidative stress. We suggested that the oxidative stress antimony-induced might be involved with some of the highly toxic adverse effects of antileishmanial drugs. This conclusion is supported by the following observations: a) the acute administration of meglumine antimoniate to uninfected mice increased protein carbonylation content in the heart, kidney, spleen and brain; b) caused a significant increase in peroxidation of polyunsaturated fatty acids in the liver, spleen and brain; c) did not change SOD activity in the liver, but increased its activity in the spleen, and decreased it in the heart, kidney and brain; d) and did not modify CAT activity in the heart, kidney and spleen, but inhibited its activity in the liver and brain.

Pentavalent antimony (Sb^{V}) remains the firstline treatment for leishmaniasis. The therapeutic activity often involves reaction with sulfohydryl groups of enzymes and/or a selective toxicity against the parasite. Concerning to this, it was

demonstrated that inside the parasites, trivalent antimony (Sb^{III}) reacts with trypanothione, inhibits the trypanothione reductase activity and induces rapid efflux of trypanothione and glutathione (Wyllie et al., 2004), which are essential antioxidant systems that protect parasites and host mammalian cells against the cytotoxic effect of nitrogen-derived reactive species (Romão et al., 2006).

During its life cycle, the protozoan parasite *Leishmania* experiences oxidative stress when interacting with activated macrophages. Oxidative stress occurs when there is excessive free-radical generation or a low antioxidant level. In excess, ROS and RNS can attack the polyunsaturated fatty acids of membrane lipids, causing lipid peroxidation and the disorganization of cell structure and function (Halliwell et al., 1992). ROS-mediated lipid peroxidation results in generation of malondialdehyde (MDA), a highly toxic molecule, which is used as a biological marker of oxidative stress (Halliwell et al., 1992).

Most frequent adverse effects related to systemic administration of meglumine antimony include urticaria, nausea, lethargy, arthralgia, abdominal pain (Davidson, 1998; Guerin et al., 2002). Moreover, some symptoms comes after chronic treatment due to accumulation of drug in tissues, and strongly contribute to reduction or withdrawal from the antimony treatment, such as mialgia, pancreatitis, nephrotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity (Croft et al., 2006). Neither the traditional second-line drugs such pentamidine and amphotericine B, also very toxic to humans, nor the recent oral agent miltefosine provides a clear alternative for the treatment of leishmaniasis (Guerin et al., 2002). For this reason, we considered it to be of interest to continue searching about the mechanism of host toxicity of pentavalent antimony to create pharmacological strategies to minimize the problem. Exposure to pentavalent antimony can produce cellular and organic injury, particularly in the heart, lung, liver and kidney but the exact mechanisms of action are not well understood (Leonard and Gerber, 1996). Indeed, there are already links between Sb^{V} incubation and ROS and nitric oxide (NO) production by *Leishmania*-infected macrophages (Basu et al., 2006, Mann et al., 2006). Furthermore, it has been suggested that oxidative stress may contribute to the progression of human cutaneous leishmaniasis. In this context, there are some reports showing that endogenous antioxidant functions are altered during infection (Kocyigit et al., 1998; Erel et al., 1999; Kocyigit et al., 2003; Vural et al., 2004; Kocyigit et al., 2005; Serarslan et al., 2005).

Our study showed that the acute administration of Sb^V increased protein carbonylation levels in the heart, kidney, spleen and brain of treated animals. In patients with cutaneous leishmaniasis, plasma protein carbonyl levels were higher, but not statistically significant compared with those of healthy subjects. Protein carbonylation is the most widely used biomarker for oxidative damage to proteins (Dalle-Donne et al., 2006). Carbonyl groups are introduced into proteins by a variety of oxidative pathways. ROS can react directly with the protein or they can react with molecules such as sugars and lipids, generating products (reactive carbonyl species) that react with proteins. A large number of neurodegenerative diseases are directly associated with the accumulation of carbonylated proteins (Dalle-Donne et al., 2006).

In this study increased TBARS levels in the liver, spleen and brain of mice treated with meglumine antimoniate were consistent with the other studies that used plasma MDA levels as a marker of oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis (Vural et al., 2004; Serarslan et al., 2005; Kocyigit et al., 2005). The brain is particularly prone to oxidative damage due to its high content of peroxidizable fatty acids and limited antioxidant capacity (Floyd, 1999). Lipid peroxidation is one of the major consequences of free radical-mediated injury to cells. It changes fluidity and permeability of membrane cells and, consequently, impairs the activity of membrane-bound enzymes, the binding of molecules to receptors, cellular interactions, nutrient transport, and the function of second messengers systems (Meagher and FitzGerald, 2000). Furthermore, change in lipid content on oxidative damage leads to change in the permeabilization of mitochondrial membrane and release of proapoptotic proteins into the cytosol activating cellular proteases (Hengartner, 2000), and leading to a cellular instability and death.

Cardiac toxicity is probably the principal cause of death in some patients treated with antimonials (Winship, 1987). Tirmenstein and colleagues (1995) have demonstrated that potassium antimonyl tartrate (PAT) induces a lethal oxidative stress in cultured cardiac myocytes, which was correlated with decreased protein thiols, GSH and ATP levels (Tirmenstein et al., 1997). Moreover, it was demonstrated that antimony compounds prolonged the potential action of guinea pig ventricular myocytes via an increase in cardiac calcium currents, which were very sensitive to the potassium antimony (III) tartrate (Kuryshv et al., 2006).

Chulay and colleagues (1988) reported that most of the administered antimony was rapidly eliminated by the kidney after an initial intramuscular injection, but nadir

concentrations increased gradually during repeated exposure. In fact, in the present study we did not observe damage to polyunsaturated fatty acid from renal tissues after 3 days of treatment with antimony. These results might suggest that renal short exposure to antimony did not significantly affect renal tissue.

To protect against oxidative damage, mammalian hosts have developed a variety of defenses including metal scavenging proteins, enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. Considering that carbonylated proteins and lipid peroxidation may reflect the effects induced by multiple forms of free radical species, the current study aimed to measure the activity of two free radical scavenging enzymes superoxide dismutase and catalase in meglumine antimoniate-treated mice.

Our data also demonstrated that the acute administration of meglumine antimoniate increased SOD activity in spleen, while decreased it in the heart, kidney and brain. Moreover, CAT activity was decreased only in the liver and brain. There is not available data in the literature about the effects of administration of meglumine antimoniate in CAT or SOD activity in these structures. Serarslan and colleagues (2005) have demonstrated that serum SOD activity was decreased in cutaneous leishmaniasis patients. These authors showed that after treatment with meglumine antimoniate or sodium stibogluconate the SOD activity values were similar to those of healthy controls.

SOD metabolizes superoxide anion, producing hydrogen peroxide (H_2O_2), which can react with iron to generate highly reactant hydroxyl radicals via the Fenton reaction. CAT is the most important peroxidase in detoxifying excess hydrogen peroxide to prevent hydroxyl production. Thus, alterations on the redox state can lead to an imbalance between SOD and CAT activities and to oxidative stress (Matés and Sánchez-Jiménez, 1999; Klamt et al., 2001). This is possibly the mechanism by which meglumine antimoniate causes damage to lipid and proteins, specially, as showed in the present study, in the brain, liver and spleen. In fact, a clear imbalance between SOD and CAT activity was found in brain, spleen and liver tissues. In brain and liver structures CAT activity was significantly reduced at all doses compared to control, thus prompting to the accumulation of the highly reactive oxygen species hydrogen peroxide. On the other hand, in spleen SOD activity was significantly increased at all doses. The effects of the significant imbalance between SOD and CAT activity in the brain, spleen and liver were noted by the substantial increase in lipid peroxidation levels and protein carbonyl formation.

Our data demonstrated that *in vivo* meglumine antimoniate induces oxidative stress. Therefore, we believe that meglumine antimoniate can act as a double-edged sword, not only it decrease intracellular thiol buffer in parasites by promoting loss of trypanotione and glutathione but it decrease antioxidants capacity of infected and also non-infected cells, perturbing mainly the antioxidant defense based on GSH/Glutathione reductase. Our hypothesis to explain the high toxicity of antileishmanial drug is that the oxidative stress induced on parasite infected and also on non-infected cells by meglumine antimony could be amplified by the production of ROS and RNS by *Leishmania*-infected cells as a defense strategy during immune response. Thus, an imbalance between the oxidant and antioxidant systems may contribute to the progression of the disease and also to induce oxidative damage in non-infected cells of different tissues. Further studies aiming to investigate the effectiveness of antioxidant supplements in patients suffering from leishmaniosis in order to counteract the oxidative damage are worth of doing.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105,121-126.
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* 32, 279-312.
- Basu, J.M., Mookerjee, A., Sen, P., Bhaumik, S., Sen, P., Banerjee, S., Naskar, K., Choudhuri, S.K., Saha, B., Raha, S., Roy, S., 2006. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 50, 1788-1797.
- Chulay, J.D., Fleckenstein, L., Smith, D.H., 1988. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 69-72.
- Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V., 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123, 399-410.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 389-406.
- Davidson, R.N., 1998. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs.* 56, 1009-1018.
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421-431.
- Erel, O., Kocyigit, A., Bulut, V., Gurel, M.S., 1999. Reactive nitrogen and oxygen intermediates in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94, 179-83.
- Ferreira, C.S., Martins, P.S., Demicheli, C., Brochu, C., Ouellette, M., Frézard, F., 2003. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals.* 16, 441-446.
- Floyd, R.A., 1999. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 236-245.
- Guerin, P.J., Olliaro, P., Sundar, S., Boalaert, M., Croft, S.L., Desjeux, P., Wasunna, M.K., Brycesoniero, A.D.M., 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.* 2, 494-501.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E., 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119, 598-620.
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407, 770-776.
- Ibrahim, M.E., Hag-Ali, M., el-Hassan, A.M., Theander, T.G., Kharazmi, A., 1994. *Leishmania* resistant to sodium stibogluconate: drug-associated macrophage-dependent killing. *Parasitol. Res.* 80, 569-574.
- Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Conte da Frota Jr., M.L., Walz, R., Andrades, M.E., Silva, E.G., Brentani, R.R., Izquierdo, I., Moreira, J.C.F., 2001. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1137-1144.
- Kocyigit, A., Erel, O., Gurel, M.S., Avci, S., Aktepe, N., 1998. Alterations of serum selenium, zinc, copper, and iron concentrations and some related antioxidant enzyme activities in patients with cutaneous leishmaniasis. *Biol. Trace Elem. Res.* 65, 271-281.
- Kocyigit, A., Gurel, M.S., Ulukanligil M., 2003. Erythrocyte antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation levels in patients with cutaneous leishmaniasis. *Parasite.* 10, 277-281.

- Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H., Erel, O., 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat. Res.* 585, 71-78.
- Kuryshv, Y.A., Wang, L., Wible, B.A., Wan, X., Ficker, E., 2006. Antimony-based antileishmanial compounds prolong the cardiac action potential by an increase in cardiac calcium currents. *Mol. Pharmacol.* 69, 1216-1225.
- Leonard, A., Gerber, G.B., 1996. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds. *Mutat. Res.* 366, 1-8.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mann, K.K., Davison, K., Colombo, M., Colosimo, A.L., Diaz, Z., Padovani, A.M., Guo, Q., Scrivens, P.J., Gao, W., Mader, S., Miller Jr., W.H., 2006. Antimony trioxide-induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. *Toxicol. Lett.* 160, 158-170.
- Matés, J.M., Sánchez-Jiménez, F., 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosci.* 4, 339-345.
- Meagher, E.A., FitzGerald, G.A., 2000. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1745-1750.
- Molyneux, D.H., 1997. Current public health status of the Trypanosomiasis and Leishmaniasis. In: Hide, G., Mottran, J.C., Coombs, G.H. (Eds). *Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Biology and Control*. CAB International, Oxford, UK.
- Roberts, W.L., McMurray, W.J., Rainey, P.M., 1998. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimoniate (Glucantime). *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1076-1082.
- Romão, P.R., Tovar, J., Fonseca, S.G., Moraes, R.H., Cruz, A.K., Hothersall, J.S., Noronha-Dutra, A.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2006. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 355-363.
- Serarslan, G., Yilmaz, H.R., Söğüt, S., 2005. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* 30, 267-271.
- Sereno, D., Holzmüller, P., Mangot, I., Cuny, G., Ouaisi, A., Lemesre, J.L., 2001. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2064-2069.
- Shaked-Mishan, P., Ulrich, N., Ephros, M., Zilberstein, D., 2001. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 276, 3971-3976.
- Sudhandiran, G., Shaha, C., 2003. 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.* 278, 25120-25132.
- Tirmenstein, M.A., Mathias, P.I., Snawder, J.E., Wey, H.E., Toraason, M., 1997. Antimony-induced alterations in thiol homeostasis and adenine nucleotide status in cultured cardiac myocytes. *Toxicology.* 119, 203-211.
- Tirmenstein, M.A., Plews, P.I., Walker, C.V., Woolery, M.D., Wey, H.E., Toraason, M.A., 1995. Antimony-induced oxidative stress and toxicity in cultured cardiac myocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130, 41-47.

- Vural, H., Aksoy, N., Ozbilge, H., 2004. Alterations of oxidative-antioxidative status in human cutaneous leishmaniasis. *Cell Biochem Funct.* 22, 153-156.
- Winship, K.A., 1987. Toxicity of antimony and its compounds. *Adverse Drug React. Acute Poisoning Rev.* 6, 67-90.
- Wyllie, S., Cunningham, M.L., Fairlamb, A.H., 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 279, 39925-39932.
- Yi, T., Pathak, M.K., Lindner, D.J., Ketterer, M.E., Farver, C., Borden, E.C., 2002. Anticancer activity of sodium stibogluconate in synergy with IFNs. *J. Immunol.* 169, 5978-5985.

Conflict of interest Statements

None disclosures

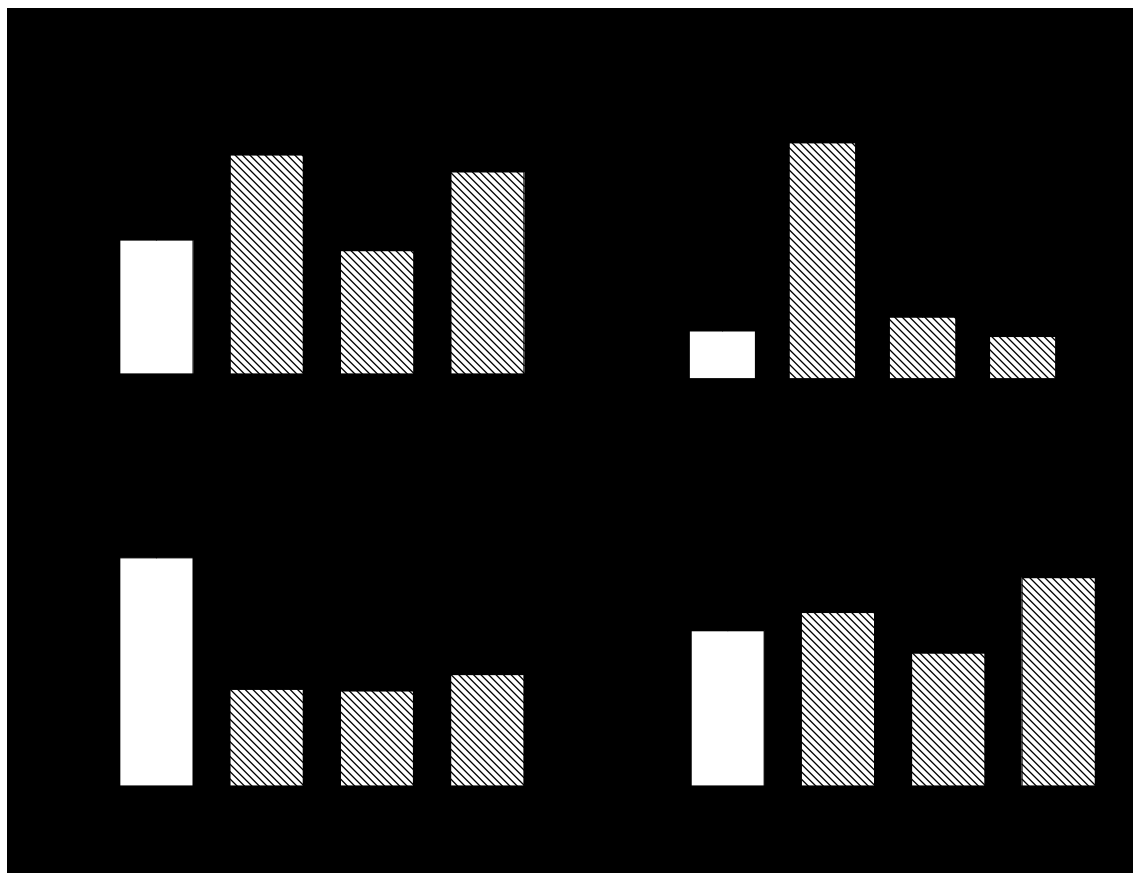


Figura 1 - Coração

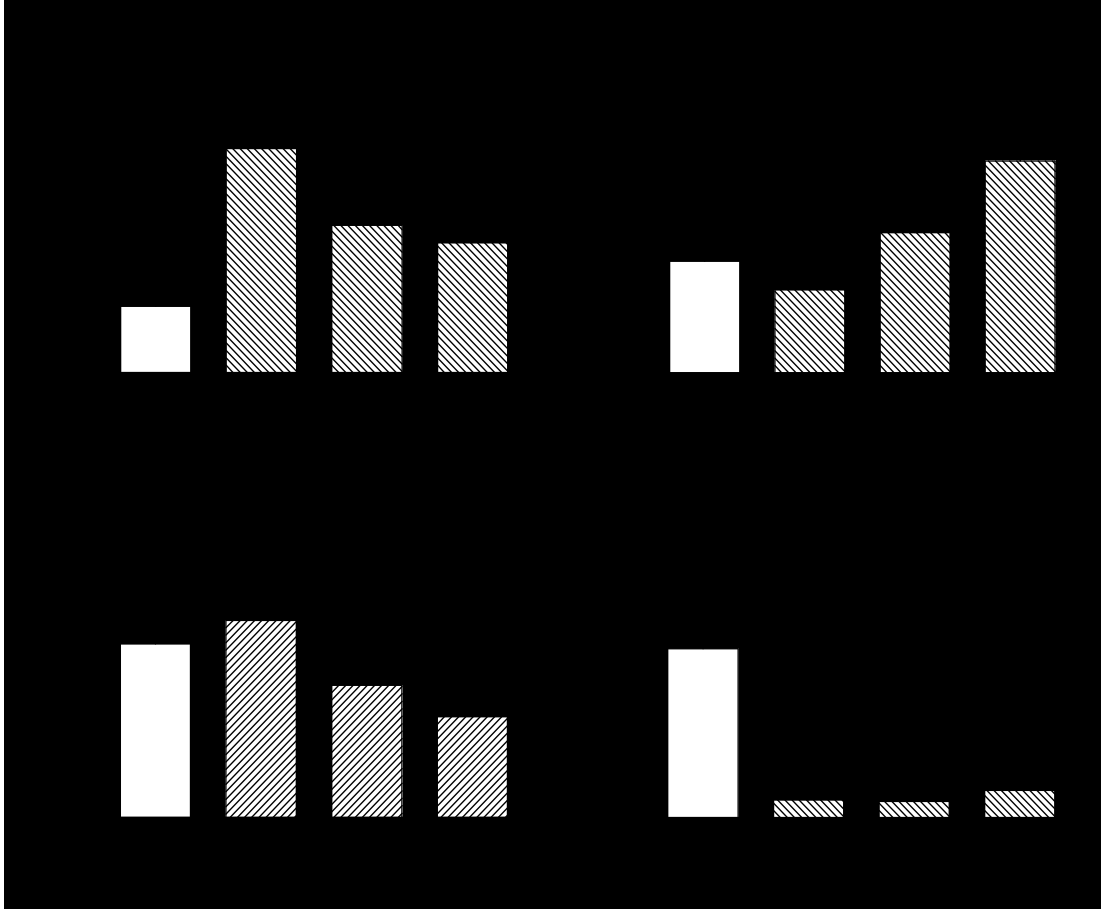


Figura 2 - Fígado

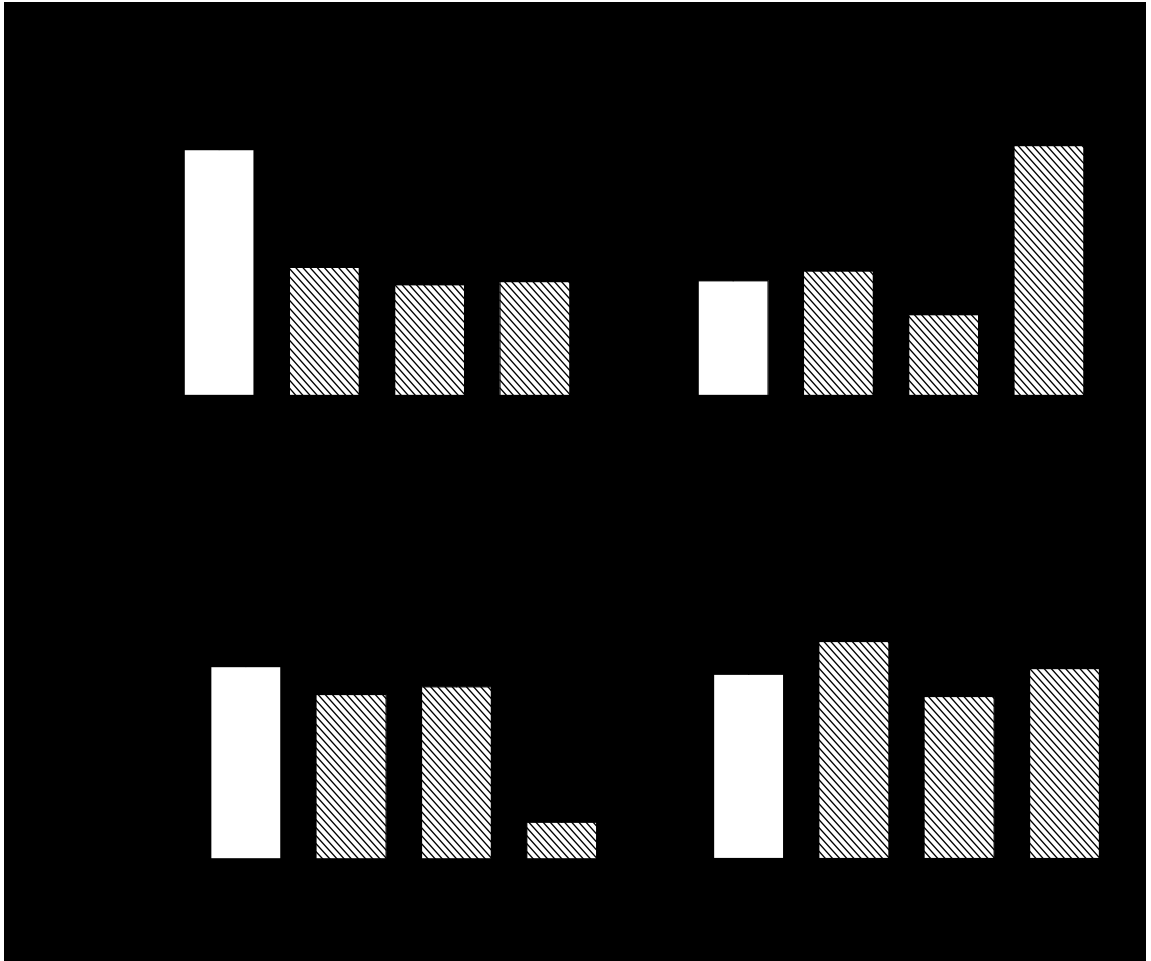


Figura 3 - Rim

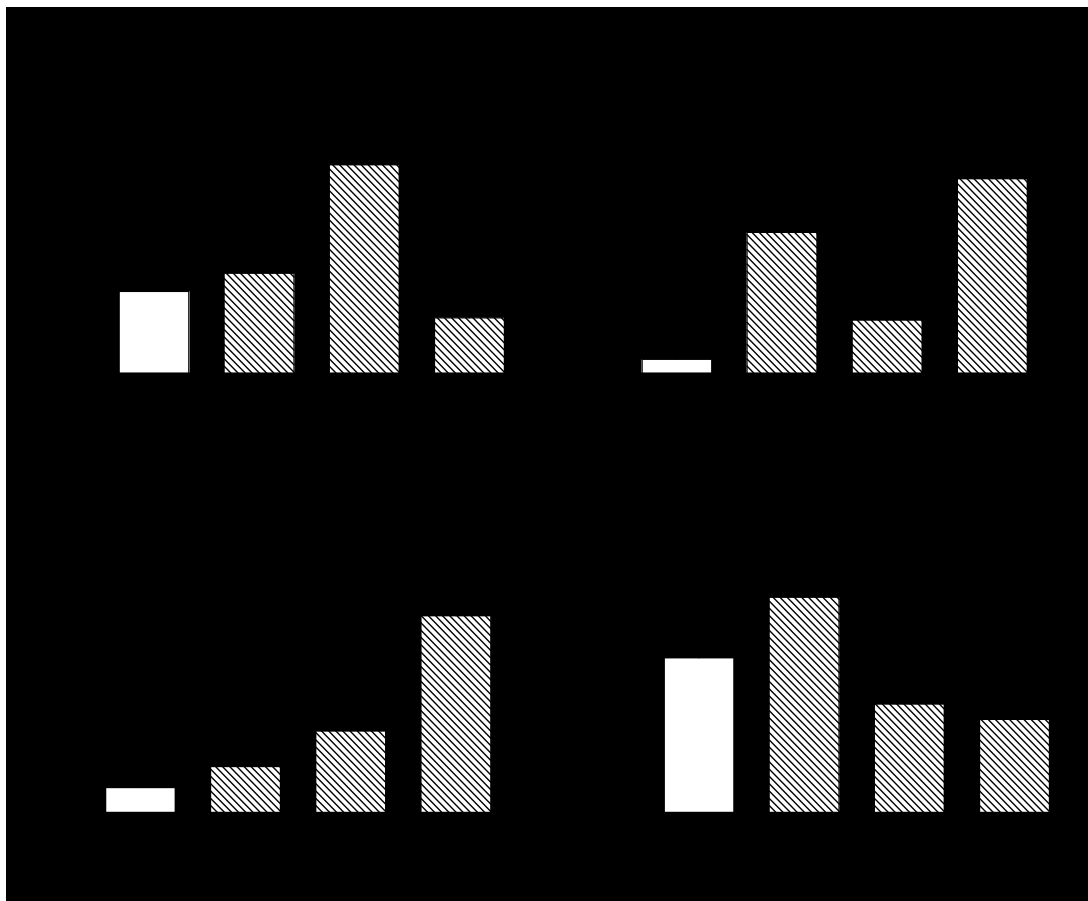


Figura 4 - Baço

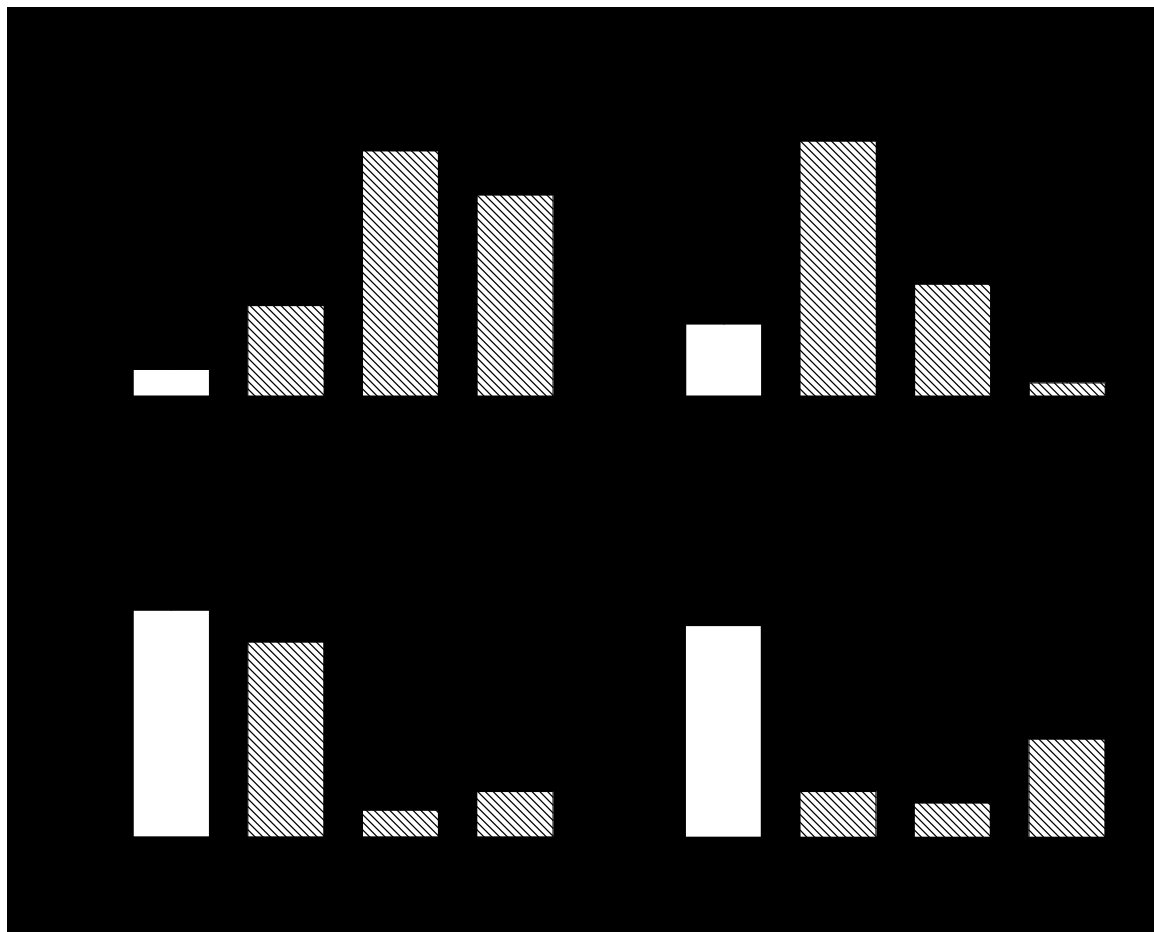


Figura 5 - Cérebro

Legends to Figures

Figure 1 – Effects of the acute administration of meglumine antimoniate (20, 60 and 120 mg/Sb^V/kg) on thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation, expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (panel A), protein carbonyl content (panel B), superoxide dismutase (SOD) (panel C) and catalase (CAT) activity (panel D) in the heart of mice assessed by a spectrophotometric assay. Data are shown as mean ± S.D. (6 mice/group). * $p < 0.05$ vs. control group according to one-way ANOVA followed by the Tukey test

Figure 2 – Effects of the acute administration of meglumine antimoniate (20, 60 and 120 mg/Sb^V/kg) on thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation, expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (panel A), protein carbonyl content (panel B), superoxide dismutase (SOD) (panel C) and catalase (CAT) activity (panel D) in the liver of mice assessed by a spectrophotometric assay. Data are shown as mean ± S.D. (6 mice/group). * $p < 0.05$ vs. control group according to one-way ANOVA followed by the *Tukey test*

Figure 3 – Effects of the acute administration of meglumine antimoniate (20, 60 and 120 mg/Sb^V/kg) on thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation, expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (panel A), protein carbonyl content (panel B), superoxide dismutase (SOD) (panel C) and catalase (CAT) activity (panel D) in the kidney of mice assessed by a spectrophotometric assay. Data are shown as mean ± S.D. (6 mice/group). * $p < 0.05$ vs. control group according to one-way ANOVA followed by the *Tukey test*

Figure 4 – Effects of the acute administration of meglumine antimoniate (20, 60 and 120 mg/Sb^V/kg) on thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation, expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (panel A), protein carbonyl content (panel B), superoxide dismutase (SOD) (panel C) and catalase (CAT) activity (panel D) in the spleen of mice assessed by a spectrophotometric assay. Data are shown as mean ± S.D. (6 mice/group). * $p < 0.05$ vs. control group according to one-way ANOVA followed by the *Tukey test*

Figure 5 – Effects of the acute administration of meglumine antimoniate (20, 60 and 120 mg/Sb^V/kg) on thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation, expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (panel A), protein carbonyl content (panel B), superoxide dismutase (SOD) (panel C) and catalase (CAT) activity (panel D) in the brain of mice assessed by a spectrophotometric assay. Data are shown as mean ± S.D. (6 mice/group). * $p < 0.05$ vs. control group according to one-way ANOVA followed by the *Tukey test*

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que o tratamento com antimoniato de meglumina induziu estresse oxidativo em diversos órgãos de camundongos não-infectados com *Leishmania*, sugerindo que a produção de espécies reativas de nitrogênio ou de oxigênio induzidas diretamente pelo antimônio, podem gerar estresse oxidativo. Desse modo, sugere-se que o estresse oxidativo induzido pelo antimônio pode estar envolvido com os alguns dos efeitos adversos altamente tóxicos do antimoniato de meglumina. Esta conclusão é suportada pelas seguintes observações: a) a administração aguda do antimoniato de meglumina aos camundongos não-infectados aumentou o índice de carbonilação de proteínas no coração, rim, baço e cérebro dos animais; b) causou um aumento significativo na peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados no fígado, no baço e no cérebro; c) aumentou significativamente a atividade da SOD no baço e reduziu sua atividade no coração, rim e cérebro; e, d) não modificou a atividade da CAT no coração, rim e baço, mas inibiu sua atividade no fígado e cérebro dos animais tratados.

Antimônios Pentavalentes (Sb^{+5}) permanecem como primeira opção para o tratamento das leishmanioses. Sua atividade terapêutica frequentemente envolve a reação com os grupos sulfidril das enzimas e/ou toxicidade seletiva contra estruturas do parasita. Neste sentido, demonstrou-se que no interior dos parasitas, o antimônio trivalente (Sb^{+3}) reage com a tripanotona, inibe a atividade da tripanotona redutase e induz o rápido efluxo do tripanotona e glutatona (Wyllie et al., 2004), que são sistemas antioxidantes essenciais para proteção do parasita e células do hospedeiro contra os efeitos citotóxicos de espécies reativas derivadas do nitrogênio (Romão et al., 2006).

Durante seu ciclo de vida, os protozoários do gênero *Leishmania* são expostos ao estresse oxidativo gerado no interior de macrófagos ativados. O estresse oxidativo ocorre quando há uma geração excessiva de radicais livres e ou um baixo nível de antioxidantes. Em excesso, ERO e ERN podem atacar ácidos graxos polinsaturados, causando peroxidação lipídica e a desorganização da estrutura e função da célula (Halliwell et al., 1992). A peroxidação lipídica mediada por ERO conduzem à geração do malondialdeído (MDA), uma molécula altamente tóxica usada como um marcador biológico do estresse oxidativo (Halliwell et al., 1992).

Os efeitos adversos freqüentemente relacionados com a administração sistêmica do antimônio do meglumina incluem: urticária, náusea, letargia, artralgia, dor abdominal (Davidson, 1998; Guerin et al., 2002). Além disso, em tratamentos crônicos, o acúmulo do antimônio em tecidos como baço e fígado, pode causar mialgia, pancreatites, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e hepatotoxicidade, que conduzem a redução ou a suspensão do tratamento (Croft et al., 2006). Os medicamentos de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose como a pentamidina, anfotericina B e miltefosine ou são muito tóxicos, ou não apresentam uma alternativa eficaz (Guerin et al., 2002). Por estas razões, é de fundamental importância investigar os mecanismos de toxicidade do Sb^{5+} , para criar estratégias farmacológicas que possam minimizar seus efeitos. A exposição ao Sb^{5+} pode produzir dano celular, particularmente no coração, pulmão, fígado e rim. No entanto, os mecanismos destas ações não são bem compreendidos (Leonard & Gerber, 1996).

Estudos demonstram que *in vitro* macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com antimônio pentavamente produzem tanto EROs como óxido nítrico

(Mann et al., 2006; Basu et al., 2006). Além disso, foi sugerido que o estresse oxidativo pode contribuir para a progressão da leishmaniose cutânea humana. Neste contexto, há alguns relatos mostrando que as funções antioxidantes endógenas estão alteradas durante a infecção (Kocyigit et al., 1998; Erel et al., 1999; Kocyigit et al., 2003; Vural et al., 2004; Serarslan et al., 2004; Kocyigit et al., 2005).

Este estudo mostrou que a administração aguda de Sb^{5+} aumentou os níveis de carbonilação de proteínas no coração, no fígado, no rim, no baço e no cérebro de animais tratados. Em pacientes com leishmaniose cutânea, os níveis plasmáticos de carbonilação de proteínas eram mais elevados, mas não estatisticamente significativos em relação àqueles encontrados nos indivíduos saudáveis (controles não infectados). A carbonilação de proteínas é o biomarcador mais amplamente utilizado como indicativo de dano oxidativo em proteínas (Dalle-Donne et al., 2006). Os grupamentos carbonil são introduzidos em proteínas por uma variedade de vias oxidativas. ERO podem reagir diretamente com a proteína ou podem reagir com moléculas tais como os açúcares e lipídios, gerando os produtos (espécie reativas ao carbonil) que reagem com as proteínas. Um grande número de doenças neurodegenerativas são associadas diretamente com o acúmulo de proteínas carboniladas (Dalle-Donne et al., 2006).

Neste estudo os níveis aumentados de TBARS no fígado, baço e cérebro dos camundongos tratados com o antimoniato do meglumina estão de acordo com outros estudos que avaliaram os níveis de MDA plasmáticos como marcador de estresse oxidativo em pacientes com leishmaniose cutânea (Vural et al., 2004; Serarslan et al., 2005; Kocyigit et al., 2005). O cérebro é particularmente sensível ao dano oxidativo provavelmente devido a seu elevado teor de ácidos graxos e sua limitada capacidade antioxidante (Floyd, 1999). A peroxidação lipídica é uma das

principais conseqüências da ação dos radicais livres sobre as células. Ela modifica a fluidez e permeabilidade das membranas celulares, inibe a atividade de enzimas, interfere com interações celulares, transporte nutriente e função de segundos mensageiros (Meagher e FitzGerald, 2000). Além disso, o dano oxidativo a lipídios leva a mudanças na permeabilização da membrana mitocondrial, com liberação de proteínas pro-apoptóticas no citosol que ativam proteases celulares que induz a morte celular (Hengartner, 2000). A peroxidação de lipídios conduz também à produção de hidroperóxidos diênicos conjugados, produzindo substâncias instáveis que se decompõe em vários aldeídos e reagem com o ácido tiobarbiturico, produzindo TBARS que pode ser medido por um ensaio espectrofotométrico (Hengartner, 2000).

A toxicidade cardíaca é provavelmente a principal causa de morte em pacientes tratados com os antimoniais (Winship, 1987). Tirmenstein e colaboradores (1995) demonstraram que o tartarato de antimônio de potássio (PAT) induz morte celular de miócitos em cultura através da indução de estresse oxidativo. A morte celular foi correlacionada com diminuição dos níveis de tóois, GSH e ATP (Tirmenstein et al., 1997). Além disso, demonstrou-se que os compostos do antimônio prolongaram o potencial de ação de miócitos ventriculares de cobaias, através de um aumento nas correntes de cálcio, que eram muito sensíveis ao antimônio trivalente (PAT) (Kuryshv et al., 2006).

Chulay e colaboradores (1988) relataram que inicialmente a maior parte do antimônio administrado por via intramuscular, em humanos, sofre rápida eliminação pelo rim, mas as concentrações plasmáticas aumentam gradualmente durante a exposição repetida. De fato no presente estudo não se observou dano a lipídios

renais após três dias de tratamento. Estes resultados sugerem que a curta exposição ao antimoniato de meglumina não afetou significativamente o tecido renal.

Para se proteger do dano oxidativo, os mamíferos desenvolveram uma variedade de defesas que incluem proteínas seqüestradoras de metais, sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Considerando que a carbonilação de proteínas e a peroxidação lipídica podem refletir os efeitos induzidos por múltiplas formas de espécies reativas derivadas do nitrogênio ou oxigênio, o presente estudo também avaliou a atividade de duas enzimas antioxidantes, a SOD e a CAT em vários tecidos de camundongos tratados com antimônio de meglumina.

Nossos dados demonstraram que a administração aguda do antimoniato do meglumina aumentou significativamente a atividade da SOD no baço, e inibiu sua atividade no coração, rim e cérebro. Com relação a CAT, sua atividade foi diminuída no fígado e cérebro dos animais tratados com o antimoniato de meglumina. Não há dados disponíveis na literatura sobre os efeitos da administração do antimoniato do meglumina sobre a atividade da CAT e da SOD nestas estruturas. Serarslan e colaboradores (2005) demonstraram que a atividade da SOD esteve diminuída no soro de pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea. Estes autores mostraram que após o tratamento com antimoniato do meglumina ou estibogluconato de sódio a atividade da SOD era equivalente àquela determinada no soro de indivíduos saudáveis. A SOD metaboliza o ânion superóxido, produzindo água oxigenada (H_2O_2), que pode reagir com o ferro e gerar radical hidroxil através da reação de Fenton. CAT é uma das enzimas com ação peroxidase mais importante para prevenir esta produção. Desse modo, alterações no estado redox pode conduzir a um desequilíbrio entre as atividades da SOD e da CAT e ao estresse oxidativo (Matés e Sánchez-Jiménez, 1999; Klamt et al., 2001). Este é

possivelmente um dos mecanismos pelos quais o antimoniato de meglumina causa dano a lipídios e proteínas, especialmente, como mostrados no presente estudo no cérebro, fígado e baço. De fato, um evidente desequilíbrio entre SOD e CAT foi encontrado no cérebro, baço e fígado dos camundongos tratados com antimoniato de meglumina. No fígado e baço dos animais tratados com antimoniato de meglumina a atividade da CAT foi significativamente reduzida em todas as doses testadas, favorecendo o acúmulo de peróxido de hidrogênio. No baço a atividade da SOD foi significativamente aumentada nos animais tratados. O significativo efeito do desbalanço entre SOD e CAT no baço, fígado e cérebro dos animais tratados foi evidente pelo substancial aumento nos níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.

Nós sugerimos que *in vivo* o antimoniato do meglumina induz o estresse oxidativo. Por isso, nós supomos que o antimoniato do meglumina pode atuar não somente reduzindo o poder redutor de tióis dos parasitas, através da perda de tripanotiona e de glutathiona, mas também pela diminuição da capacidade antioxidante de células infectadas e não infectadas do hospedeiro, alterando principalmente a defesa antioxidante baseada em GSH/GR. Nossa hipótese para explicar a toxicidade elevada dos antimoniais usados no tratamento da leishmaniose é que o estresse oxidativo induzido diretamente nos parasitas, e também em células infectadas e não-infectadas pelo antimoniato de meglumina pode ser amplificado pela produção de ERO e de ERN por células infectadas com *Leishmania*, como uma estratégia da defesa durante a resposta imune. Assim, um desequilíbrio entre oxidantes e os sistemas antioxidantes pode contribuir a progressão da doença e igualmente induzir dano oxidativo em células não-infectadas de tecidos diferentes.

O benefício clínico da administração de antioxidantes em pacientes com leishmaniose para contrabalançar o dano oxidativo induzido pelos antimoniais e pela própria resposta imune precisa ser avaliado.

REFERÊNCIAS

BAFICA A; OLIVEIRA F; FREITAS LA; NASCIMENTO EG; BARRAL A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *International Journal of Dermatology* 42: 203-207. 2003.

BARRAL A; SAMPAIO PD; GRIMALDI JRG; MOMEN H; MCMAHON-PRATT D; RIBEIRO JA; ALMEIDA R; BADARO R; BARRAL NM; CARVALHO EM. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 536-546. 1991.

BARREIROS ALBS; DAVID JM; DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29: 113-123. 2006.

BASU JM; MOOKERJEE A; SEN P; BHAUMIK S; SEN P; BANERJEE S; NASKAR K; CHOUDHURI SK; SAHA B; RAHA S; ROY S. Sodium antimony gluconate induced generation of reactive oxygen and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 1788-1797. 2006.

BERMAN JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of Infectious Diseases* 10: 560-586. 1988.

BERMAN JD; WYLER DJ. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 142: 83-86. 1980.

BHATTACHARYA SK; SINHA PK; SUNDAR S; THAKUR CP; JHA TK; PANDEY K; DAS VR; KUMAR N; LAL C; VERMA N; SINGH VP; RANJAN A; VERMA RB; ANDERS G; SINDERMANN H; GANGULY NK. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 196: 591-598. 2007.

BLANK C; FUCHS H; RAPPERSBERGER K; RÖLLINGHOFF M; MOLL H. Parasitism of epidermal langerhans cells in experimental cutaneous Leishmaniasis with *Leishmania major*. *Journal of Infectious Diseases* 167: 418-425. 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Superintendência de Vigilância Epidemiológica. Relatório de Notificações de Leishmanioses no Brasil, período de 1985 a 2005. Brasília: Ministério da Saúde. 2006.

CHANG KP; CHAUDHURI G; FONG D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. Annual Review Microbiology 44: 499-529. 1990.

CHAPPUIS F; SUNDAR S; HAILU A; GUALIB H; RIJAL S; PEELING RW; ALVAR J; BOELAERT M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature Reviews Microbiology 5: 873-882. 2007.

CHULAY JD; FLECKENSTEIN L; SMITH DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 82: 69-72. 1988.

CONTI M; MORAND PC; LEMONNIER A. Improved fluorimetric determination of malondialdehyde. Clinical Chemistry 37: 1273-1275. 1991.

CROFT SL; SEIFERT K; YARDLEY V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. The Indian Journal of Medical Research 123: 399-410. 2006.

DALLE-DONNE I; ALDINI G; CARINI M; COLOMBO R; ROSSI R; MILZANI A; Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10: 389-406. 2006.

DAVIDSON RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* 56: 1009-1018. 1998.

DESJEUX F. Leishmaniasis: Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology* 14: 417-423. 1996.

DORVAL ME; OSHIRO ET; CUPOLLILO E; CASTRO AC; ALVES TP. Occurrence of American tegumentary Leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 43-46. 2006.

DUMAS C; OUELLETTE M; TOVAR J; CUNNINGHAM ML; FAIRLAMB AH; TAMAR S; OLIVIER M; PAPADOPOULOU B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *The EMBO Journal* 16: 2590-2598. 1997.

EREL O; KOCYIGIT A; BULUT V; GUREL MS. Reactive nitrogen and oxygen intermediates in patients with cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 179-183. 1999.

FELICETTI SA; ROBERT GT; ROGER OM. Metabolism of Two Valence States of Inhaled Antimony in Hamsters. American Industrial Hygiene Association Journal 35: 292-300. 1974.

FERREIRA ALA; MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira 43: 61-68. 1997.

FLOYD RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 222: 236-245. 1999.

FOLI A; SAVILLE MW; BASELER MW; YARCHOAN R. Effects of the th-1 and th-2 stimulatory cytokines interleukin-12 and interleukin-4 on human immunodeficiency virus replication. The EMBO Journal 85: 2114-2123. 1995.

GACARTER KC; SUNDAR S; SPICKETT C; PEREIRA OC; MULLEN AB. The in vivo susceptibility of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is drug specific and can be reversed by inhibiting glutathione biosynthesis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47: 1529-1535. 2003.

GANTT KR; GOLDMAN TL; MCCORMICK ML; MILLER MA; JERÔNIMO SMB; NASCIMENTO ET; BRITIGAN BE; WILSON ME. Oxidative response of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. The Journal of Immunology 167: 893-901. 2001.

GRIMALDI GJR; SOARES MJ; MORIEARTY PL. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous Leishmaniasis. Parasite Immunology 6: 397-408. 1984.

GRIMALDI GJR; TESH RB. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. Clinical Microbiology Reviews 6: 230-250. 1993.

GRIMALDI GJR; TESH RB; PRATT MD. A review of the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the New World. The American Society of Journal Tropical Medicine Hygiene 41: 687-725. 1989.

GRONDIN K; HAIMEUR A; MUKHOPADHYAY R; ROSEN BP; OUELLETTE M. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the ABC transporter gene pgpA in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. The EMBO Journal 16: 3057-3065. 1997.

GUERIN PJ; OLLIARO P; SUNDAR S; BOALAERT M; CROFT SL; DESJEUX P; WASUNNA MK; BRYCESONIERO ADM. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. Lancet Infectious Diseases 2: 494-501. 2002.

HADIGHI R; MOHEBALI M; BOUCHER P; HAJJARAN H; KHAMESIPOUR A; OUELLETTE M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian

cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. Plos Medicine 3: 659-667. 2006.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JM; CROSS CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? The Journal of laboratory and clinical medicine 119: 598-620. 1992.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. Free radical in biology and medicine. University Press, Oxford, pp. 543. 1989.

HASHIGUCHI Y; GOMEZ EA; CORONEL VV; MIMORI T; KAWABATA M; FURUYA M; NONAKA S; TAKAOKA H; ALEXANDER JB; QUIZHPE AM. Andean Leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and L. major-like parasites. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 44: 205-217. 1991.

HEINZEL FP; SCHOENHAUT DS; RERKO RM; ROSSER LE; GATELY MK. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. Journal of Experimental Medicine 177: 1505-1509. 1993.

HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. Nature 407: 770-776. 2000.

HIMMELRICH H; LAUNOIS P; MAILLARD I; BIEDERMANN T; TACCHINI-COTTIER F; LOCKSLEY RM; ROCKEN M; LOUIS JA. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and

sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. The Journal of immunology 164: 4819-4825. 2000.

http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html - Acesso em: 22/08/2007

KENDRICK KR. Phlebotomine vectors of the Leishmaniasis: a review. Medical and Veterinary Entomology 4: 1-24. 1990.

KLAMT F; DAL-PIZZOL F; CONTE FJML; WALZ R; ANDRADES ME; SILVA EG; BRENTANI RR; IZQUIERDO I; MOREIRA JCF. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. Free Radical Biology and Medicine 30: 1137-1144. 2001.

KOCK M; MOSTERT J; ARUTJUNYAN AV; STEPANOV M; TEELKEN A; HEERSENA D; KEYSER J. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. European Journal of Neurology 14: 529-533. 2007.

KOCYIGIT A; EREL O; GUREL MS; AVCI S; AKTEPE N. Alterations of serum selenium, zinc, copper, and iron concentrations and some related antioxidant enzyme activities in patients with cutaneous leishmaniasis. Biological Trace Element Research 65: 271-281. 1998.

KOCYIGIT A; GUREL MS; ULUKANLIGIL M. Erythrocyte antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation levels in patients with cutaneous leishmaniasis. *Parasite* 10: 277-281. 2003.

KOCYIGIT A; KELES H; SELEK S; GUZEL S; CELIK H; EREL O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous Leishmaniasis. *Mutation Research* 585: 71-78. 2005.

KOROLKOVAS A; BUCKHALTER JH. Química Farmacêutica, Rio de Janeiro, pp. 516-517. pp. 469-471. 1988.

KURYSHEV YA; WANG L; WIBLE BA; WAN X; FICKER E. Antimony-based antileishmanial compounds prolong the cardiac action potential by an increase in cardiac calcium currents. *Molecular Pharmacology* 69: 1216-1225. 2006.

LEONARD A; GERBER GB; Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds. *Mutation Research* 366: 1-8. 1996.

MACHADO PR; LESSA H; LESSA M; GUIMARAES LH; BANG H; HO JL; CARVALHO EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 44: 788-793. 2007.

MANN KK; DAVISON K; COLOMBO M; COLOSIMO AL; DIAZ Z; PADOVANI AM; GUO Q; SCRIVENS PJ; GAO W; MADER S; MILLER JWH. Antimony trioxide-

induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. *Toxicology Letters* 160: 158-170. 2006.

MARSDEN PD; SAMPAIO NR; CARVALHO EM; VEIGA JPT; COSTA JLM; LIANOS-CUENTAS E. High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 710-713. 1985.

MATES JM ; SANCHEZ-JIMENEZ F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience* 4: 339-345. 1999.

MATÉS JM; GÓMEZ CP; CASTRO IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32: 595-603. 1999.

MEAGHER EA; FITZGERALD GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radical Biology and Medicine* 28: 1745-1750. 2000.

MILLER MA; MCGOWAN SE; GANTT KR; CHAMPION M; NOVICK SL; ANDERSEN KA; BACCHI CJ; YARLETT N; BRITIGAN BE; WILSON ME. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. *Journal of Biology Chemistry* 275: 33883-33889. 2000.

MOHRS M; LEDERMANN B; KOHLER G; DORFMULLER A; GESSNER A; BROMBACHER F. Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient

mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *Journal Immunology* 162: 7302-7308. 1999.

MOLINA I; FALCO V; CRESPO M; RIERA C; RIBERA E; CURRAN A; CARRIO J; DIAZ M; VILLAR DSS; FISA R; LOPEZ-CHEJADE P; OCANA I; PAHISSA A. Efficacy of liposomal amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60: 837-842. 2007.

MOMEN H; GRIMALDI GJR; PACHECO RS; JAFFE CL; MCMAHON-PRATT D; MARZOCHI MC. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 1076-1084, 1985.

MONTEIRO MC; LIMA HC; SOUZA AA; TITUS RG; ROMAO PR; CUNHA FQ. Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 88-94. 2007.

MUKHOPADHYAY R; DEY S; XU N; GAGE D; LIGHTBODY J; OUELLETTE M; ROSEN BP. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania tarentolae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10383-10387. 1996.

MULLER R; BAKER J. Medical Parasitology. Gower Medical Publishing. London. 1990.

NETO OMP; GRIMALDI GJR; MOMEN H; PACHECO RS; MARZOCHI MC; PRATT MD. Active cutaneous Leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani* chagasi. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 81: 303-309, 1986.

OLIVEIRA ALL. Estudos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da leishmaniose visceral., Mato Grosso do Sul, Brasil, 2000-2005. Tese Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Medicina Tropical., Rio de Janeiro, pp. 121. 2006.

OLIVEIRA SH; FONSECA SG; ROMÃO PR; FIGUEIREDO F; FERREIRA SH; CUNHA FQ. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. Parasite Immunology 20: 405-412. 1998.

RATH S; TRIVELLIN LA; IMBRUNITO TR; TOMAZELA DM; JESÚS MN; MARZAL PC; JUNIOR HFA; TEMPONE; AG. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado de Arte. Química Nova 26: 550–557. 2003.

REES PH; KESTING MI; KAGER PA; HOCKMEYER WT. Renal clearance ao pentavalent antimony (sodium stibogluconate). Lancet 2: 226-229. 1980.

ROBERTS LJ; HANDMAN E; FOOTE SJ. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. British Medical Journal. 321: 801-804. 2000.

ROBERTS W; MCMURRAY W; RAINEY P. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 1076-1082. 1998.

RODRIGUES AM; HUEB M; SANTOS TA; FONTES CJ. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimonate. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 139-145. 2006.

ROMÃO PR; TOVAR J; FONSECA SG; MORAES RH; CRUZ AK; HOTHERSALL JS; NORONHA-DUTRA AA; FERREIRA SH; CUNHA FQ. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39: 355-363. 2006.

SANTRICH C; SEGURA I; ARAIS AL; SARAIVA NG. Mucosal disease caused by *Leishmania brasiliensis guyanensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 51-55. 1990.

SARAVIA NG; HOLGUIN AF; PRATT MD; D'ALESSANDRO A. Mucocutaneous Leishmaniasis in Colombia: *Leishmania brasiliensis* subspecies diversity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 714-720. 1985.

SCHLEIN Y; JACOBSON RL; MESSER G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission

by bite. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89: 9944-9948. 1992.

SCOTT P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. Journal Immunology 147: 3149-3155. 1991.

Secretaria de Estado de Saúde. Governo do Estado do Mato Grosso do Sul.

Investigação Leishmaniose Visceral.

http://www.saude.ms.gov.br/index.php?templat=vis&site=116&id_comp=634&id_reg=3356&voltar=lista&site_reg=116&id_comp_orig=634 acessado em: 05 mar 2007.

SERARSLAN G; YILMAZT HR; SOGUT S. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous Leishmaniasis. Clinical and Experimental Dermatology 30: 267-271. 2005.

SINGH N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of Leishmania donovani. The Indian Journal of Medical Research 123: 411-422. 2006.

SINGH S; SIVAKUMAR R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. Journal of Infection and Chemotherapy 10: 307-315. 2004.

TESH RB. Control of zoonotic visceral Leishmaniasis: is it time to change strategies? The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 52: 287-292. 1995.

TIRMENSTEIN MA; MATHIAS PI; SNAWDER JE; WEY HE; TORAASON M.

Antimony-induced alterations in thiol homeostasis and adenine nucleotide status in cultured cardiac myocytes. *Toxicology* 119: 203-211. 1997.

TITUS RG; THEODOS CM; SHANKAR AH; HALL LR. Interactions between

Leishmania major and macrophages. *Immunology Series* 60: 437-459. 1994.

TOVAR J; WILKINSON S; MOTTRAM JC; FAIRLAMB AH. Evidence that

trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA locus. *Molecular Microbiology* 29: 653-660. 1998

VURAL H; AKSOY N; OZBILGE H. Alterations of oxidative-antioxidative status in

human cutaneous leishmaniasis. *Cell Biochemistry and Functions* 22: 153-156. 2004.

WHO online. World Health Organization 2006,

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/> - Acesso em: 14/10/2008

WINSHIP KA. Toxicity of antimony and its compounds. *Adverse Drug Reactions And*

Acute Poisoning Reviews 6: 67-90. 1987.

WYLLIE S; CUNNINGHAM ML; FAIRLAMB AH. Dual action of antimonial drugs on

thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biology Chemistry* 279: 39925-39932. 2004.

YU BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.
Physiological Review 74: 139-161. 1994.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)