

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA
COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITOS DO ENALAPRIL E DO CAPTOPRIL SOBRE A
FUNÇÃO RENAL E CÉLULAS SANGUÍNEAS DE
CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM N-
METILGLUCAMINA IN VIVO**

SUIZE SILVA OLIVEIRA

**CUIABÁ - MT
2016**

**EFEITOS DO ENALAPRIL E DO CAPTOPRIL SOBRE A FUNÇÃO RENAL
E CÉLULAS SANGUÍNEAS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS
COM N-METILGLUCAMINA IN VIVO**

Orientanda: SUIZE SILVA OLIVEIRA
Orientadora: DEIJANIRA ALVES DE ALBUQUERQUE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), para obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais, Linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Tropicais.

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

O48e Oliveira, Suize Silva.
Efeitos do enalapril e do captopril sobre a função renal e células sanguíneas de camundongos C57bl/6 tratados com N-metilglucamina in vivo / Suize Silva Oliveira. -- 2016
61 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Deijanira Alves de Albuquerque.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Cuiabá, 2016.
Inclui bibliografia.

1. inibidores da enzima conversora de angiotensina. 2. glucantime. 3. renotoxicidade. 4. associação de medicamentos. 5. leucócitos. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: EFEITOS DO ENALAPRIL E DO CAPTOPRIL SOBRE A FUNÇÃO RENAL E CÉLULAS SANGUÍNEAS DE CAMUNDONGOS C57BL6 TRATADOS COM N-METILGLUCAMINA IN VIVO

Autora: Suize Silva Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Deijanira Alves de Albuquerque

Aprovada em 12 de abril de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Deijanira Alves de
Albuquerque

Prof^a. Dr^a. Teresa Irene Ribeiro de
Carvalho Malheiros

Prof. Dr. Daniel de Moura Aguiar

Prof^a. Dr^a. Valéria Régia Franco
Sousa

Prof. Dr. José Masson

Agradecimentos

Agradeço ao meu esposo, Léo Adriano Chig pelo suporte, atenção e incentivo em todos os momentos.

Aos meus filhos Adrian, Andressa e Adriely Oliveira Chig por tornarem os meus dias cada vez mais brilhante e cheio de alegrias.

Aos meus pais, Benedito Faria de Oliveira e Diolanda Silva Oliveira, e às minhas irmãs Suze e Suzinei Silva Oliveira, cunhado Ossenir Favorito, amigos e familiares pelo apoio e por ajudarem a cuidar e colaborarem na educação dos meus filhos.

À minha amiga e orientadora professora Dr^a Deijanira Alves de Albuquerque, pela orientação desta tese.

Aos amigos que nesta longa jornada sempre estiveram ao meu lado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A Deus por não me deixar faltar coragem, animo e fé.

A todos os Professores, dentre eles ao Dr. Amílcar Sabino Damazo, Dr^a. Carmem Lúcia Bassi, Dr^a Cláudia Marlise Balbinotti Andrade, Dr. Cor Jésus Fernandes Fontes, Dr^a Eliane Ignotti, Dr. Francisco José Dutra Souto, Dr. João Henrique Gurtler Scatena, Dr^a Nair Honda Kawashita, Dr^a Rosane Christine Hahn, Dr^a Valéria Dutra, Dr^a Denise Bergamaschi, Dr. Neuber José Segri, Dr^a. Márcia Fumi Mizoi.

A amiga Carla Patrícia Amarante e Silva pelos conselhos, apoio e momentos de descontração.

Aos colegas da graduação e pós-graduação pelos momentos de convivência amigável, em especial Larissa Finger, Suzana Passos, Liziane Almeida, Jaqueline Castilho, Deborah Isoton, Juliana Lobo, Lorena P. Machado e Wesley A. Silva. Aos meus amigos de longas jornadas: Anne Gisele Prudêncio, Isabela Thommen Maciel, Viviane Cristina Mota e Aldo Passos Amorim.

A professora Dr^a. Maria Luzinete Alves Vanzeler por conceder o Laboratório de Psicofarmacologia da UFMT, onde foram realizados os experimentos com os animais.

As secretárias da pós-graduação Héliida Leseux e Juliana Rodrigues por colaborarem indiretamente com o trabalho realizado.

Ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT e aos animais utilizados nos experimentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Aos funcionários (técnicos administrativos, técnicos de laboratório, auxiliares de serviços gerais, técnicos de laboratório, seguranças, do setor administrativo) da UFMT, do HOVET e do Hospital Júlio Muller (Prof^a Dr^a Márcia Hueb e sua equipe de trabalho), por serem prestativos e pacientes ao colaborarem.

Aos colegas de trabalho do Centro Universitário – Univag e INDEA.

Ao Departamento de Ciências Básicas em Saúde, da Faculdade de Medicina em cujas dependências foram realizadas as disciplinas e os experimentos desta tese.

E por todos que fizeram parte deste momento da minha história.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Benedito Faria de Oliveira (in memoriam) e Diolanda Silva Oliveira, pela minha formação; ao meu esposo, Léo Adriano Chig e aos meus filhos, Adrian, Andressa e Adriely Oliveira Chig, sobretudo pela paciência durante a elaboração desta Tese.
Dedico*

Epígrafe
“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece” (Benjamin Disraeli).

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
REVISÃO DE LITERATURA	19
JUSTIFICATIVA	28
HIPÓTESE E OBJETIVO DO TRABALHO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
MANUSCRITO I (Aceito para publicação).....	37
Enalapril e captopril revertem o edema e a hiperplasia renais causados pelo antimoniato de N-metilglucamina em camundongos C57BL/6	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
MANUSCRITO II (Submetido).....	45
Estudo comparativo entre captopril e enalapril sobre os leucócitos periféricos e células da medula óssea em camundongos C57BL/6, tratados com antimoniato de meglumina	46
REFERENCES	52
APÊNDICES E ANEXOS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH: Hormônio antidiurético
ACE: Angiotensin-converting enzyme
Ang I: Angiotensina I
Ang II: Angiotensina II
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cp: Captopril
CV: Coeficiente de variação
ECA: Enzima conversora de angiotensina
ECG: Ecocardiograma
Ep: Enalapril
FBP: Fator potenciador da bradicinina
GP: Ganho de peso
IC: Intervalo de confiança
iECA: Inibidores da enzima conversora de angiotensina
Meg: Antimoniato de meglumina
OMS: Organização Mundial da Saúde
PBS: *Phosphate buffered saline* ou Tampão fosfato-salino
Sb^v: Antimônio
Sb⁵⁺: Sais pentavalentes
SNS: Sistema nervoso simpático
SRAA: Sistema-renina-angiotensina-aldosterona
TGO: Transaminase glutâmica oxalacética
TGP: Transaminase glutâmica pirúvica
TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha* ou fator de necrose tumoral *alpha*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enfoque metodológico.....	12
Figura 2. Fórmula estrutural do antimoniato de meglumina (C ₇ H ₁₈ NO ₈ Sb), PM: 365,98.....	16
Figura 3. Sistema-renina-angiotensina-aldosterona.....	19
Figura 4. Análise histopatológica dos rins de camundongos C57BL/6.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise histológica dos rins de camundongos C57BL/6 injetados, por via intramuscular, com salina a 0,9% ou antimoniato de N-metilglucamina e tratados ou não com enalapril ou captopril, durante 30 dias.....36

Table 2. Number of total white blood cells in peripheral blood and bone marrow of C57BL/6 mice that received saline, meglumine antimoniate, meglumine antimoniate and captopril, and meglumine antimoniate combined with enalapril.....46

ESQUEMA

O estudo foi composto por três etapas (Figura 1):

- (1) coleta de dados;
- (2) processamento dos dados;
- (3) análise e interpretação dos dados.

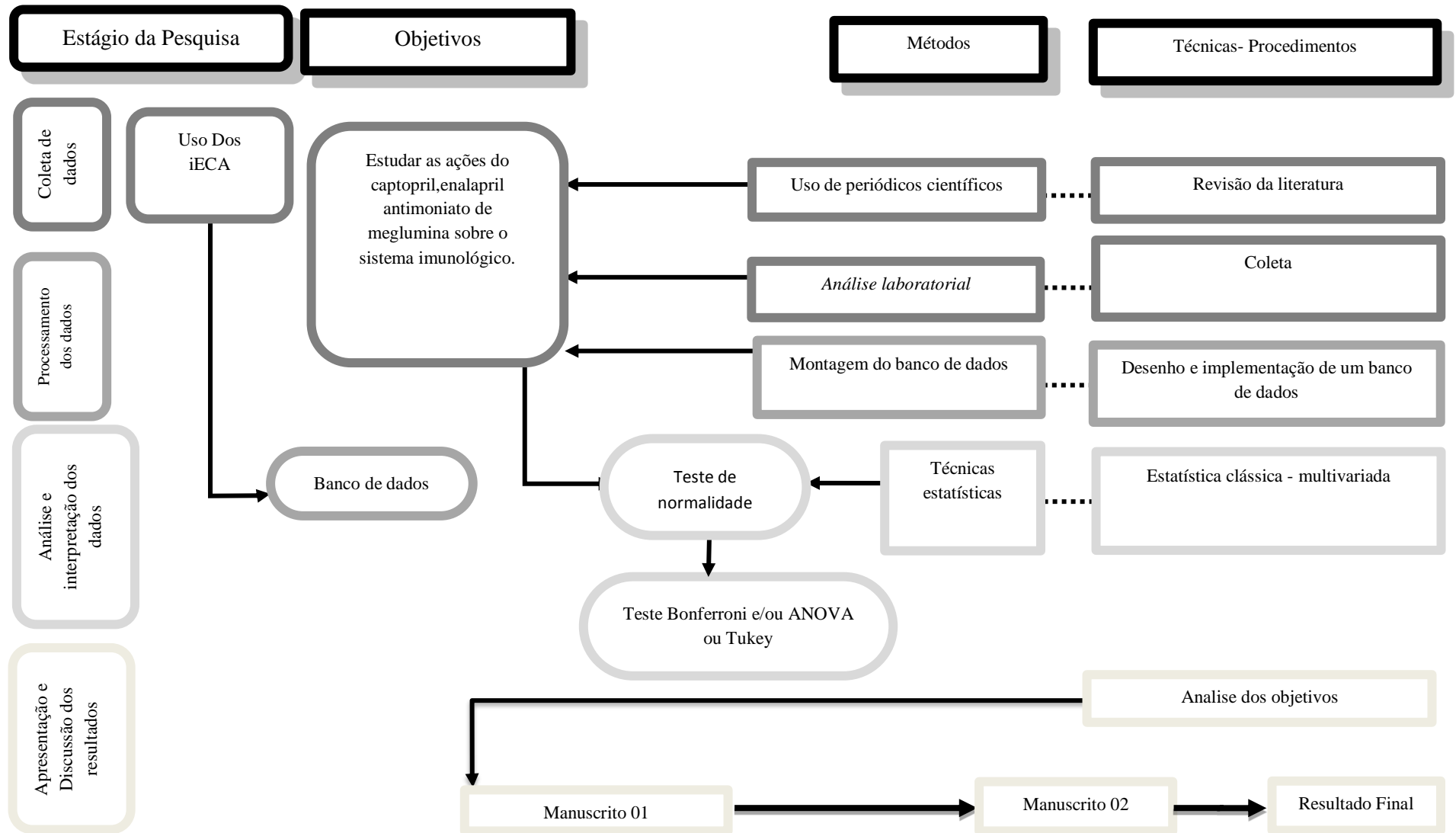


Figura 1 - Enfoque metodológico.

O objetivo deste trabalho foi verificar se o enalapril e o captopril iriam reverter o dano renal causada pelo antimoniato de N-metilglucamina em camundongos C57BL/6 e comparar os camundongos tratados com antimoniato de meglumina em associação aos inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) - o captopril e o enalapril, destacando a importância em conhecer suas ações sobre a contagem de leucócitos totais do sangue periférico e a células da medula óssea. Usou camundongos isogênicos, da linhagem C57BL/6, fêmeas, obtidos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, BA. Os camundongos foram divididos em quatro grupos como se segue: Grupo 1: recebeu solução salina por injeção intramuscular (IM); Grupo 2: recebeu antimoniato de N-metilglucamina (IM); Grupo 3: recebeu antimoniato de N-metilglucamina e captopril; Grupo 4: tratou-se com antimoniato de N-metilglucamina e enalapril. Ambos enalapril e captopril foram administrados por via oral na água de beber (*ad libitum*). Após 30 dias de tratamento, os animais foram sacrificados e os seus rins foram coletados para análise histológica. Os resultados revelaram que o enalapril reverteu completamente o edema, a hiperplasia dos podócitos e núcleo das células epiteliais dos túbulos proximais convolutos causadas por antimoniato de N-metilglucamina. Por outro lado, o tratamento captopril inibiu parcialmente os efeitos nocivos causados por antimoniato de N-metilglucamina, nos rins. O tratamento com enalapril, aumentou o número total de células da medula óssea, quando em comparação ao controle. Tomados em conjunto, conclui-se que o enalapril e captopril revertem o edema e a hiperplasia renal causada pelo antimoniato de N-metilglucamina em camundongos. A associação do antimoniato de meglumina com enalapril mostrou ter ação reguladora no número de células da medula óssea.

Palavras-chave: inibidores da enzima conversora, glucantime[®], renotoxicidade

ABSTRACT

The aim of this study was to determine whether enalapril and captopril would reverse the kidney damage caused by antimoniate N-methylglucamine in C57BL/6 mice and compare the mice treated with meglumine antimoniate in combination with inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE inhibitors) - captopril and enalapril, highlighting the importance of knowing their actions on the total leukocyte count in the peripheral blood and bone marrow cells. used inbred mice, the C57BL/6 mice, females, obtained from the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador BA. The mice were divided into four groups as follows: Group 1 received saline by intramuscular (IM) injection; Group 2 received N-methylglucamine antimonate (IM); Group 3 received N-methylglucamine antimonate and captopril; Group 4: treated with N-methylglucamine antimonate and enalapril. Both enalapril and captopril were administered orally in drinking water (ad libitum). After 30 days of treatment, animals were sacrificed and their kidneys were collected for histological analysis. The results revealed that enalapril completely reversed edema, hyperplasia of podocytes and nucleus of epithelial cells of proximal convoluted tubules caused by N-methylglucamine antimonate. Moreover, captopril treatment partially inhibited the harmful effects caused by N-methylglucamine antimonate, kidney. Enalapril treatment increased the total number of bone marrow cells, when compared to the control. Taken together, we conclude that enalapril and captopril reverse edema and renal hyperplasia caused by N-methylglucamine antimonate in mice. The association of enalapril meglumine antimoniate shown to have a regulatory role in the number of bone marrow cells.

Keywords: angiotensin-converting enzyme, glucantime, renotoxicidade.

Antimoniato de meglumina

Os medicamentos à base de antimônio pentavalente como o antimoniato *N*-metilglucamina ou antimoniato de meglumina (Glucantime®) foram introduzidos pela primeira vez em 1945, durante a Segunda Guerra Mundial, na França e permaneceram como a terapia mais eficaz para tratamento de algumas formas de leishmaniose no mundo todo [1]. A partir da década de 70, houve um grande avanço no conhecimento da biologia celular e da resposta imunológica contra a *Leishmania*, mas a quimioterapia à base de antimônio pentavalente não foi aprimorada em igual amplitude [2]. Os mecanismos de ação, a toxicidade e farmacocinética desse fármaco ainda não foram totalmente elucidados [1].

Embora o antimoniato de meglumina não possua uma estrutura química bem determinada, sabe-se que ele é formado pela síntese entre o ácido antimônio e a *N*-metil-glucamina, sendo a última obtida previamente a partir da aminação redutora da glicose em presença de metilamina [2], sendo uma mistura complexa que existe em equilíbrio na solução aquosa [3]. A Figura 2 mostra a fórmula estrutural do antimoniato de meglumina.

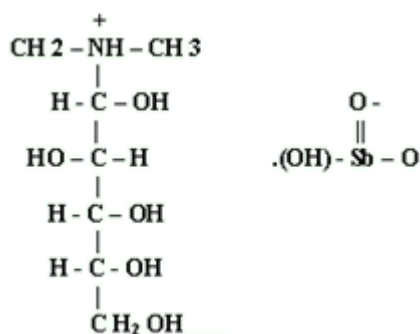


Figura 2. Fórmula estrutural do antimoniato de meglumina (C₇H₁₈NO₈Sb), PM: 365,98. [4]

O antimoniato é receitado de acordo com a quantidade de Sb(V) e é geralmente considerado como equivalente em termos de eficácia e toxicidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, e não ultrapassando o limite de 850 mg de antimônio durante todo tratamento [5], devido à sua elevada toxicidade. Após a administração endovenosa ou intramuscular, o antimoniato de meglumina é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% do antimônio são excretados nas

primeiras 48 h pelos rins [6]. Em consequência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime diário, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento [2,7,8].

Pesquisas recentes vêm sendo desenvolvidas para elucidar o mecanismo de ação, que ainda é pouco conhecido. Nos estudos de biodistribuição, ratos saudáveis apresentaram maior absorção de antimônio no fígado do que camundongos infectados com *Leishmania* e a eliminação do medicamento ocorreu principalmente através de excreção biliar, com uma pequena proporção do fármaco excretado pelos rins [9].

Tem sido sugerido que algumas particularidades químicas na composição deste fármaco podem contribuir para seu efeito farmacológico. Por exemplo, os carboidratos, como o ácido glicônico, são capazes de formar complexos solúveis em água com o átomo de antimônio, favorecendo a sua biodistribuição. Além disso, como a forma pentavalente apresenta pouca toxicidade, é possível que esta forma seja um pro-fármaco, que se converte na forma mais tóxica, trivalente, próxima de seu local de ação, ou seja, no interior dos macrófagos ou próximo destas células [10].

Efeitos colaterais

É possível que ocorra um ou mais efeitos colaterais, na seguinte ordem de frequência: artralgia [11,12,13,14,15], mialgia [2], náusea [11,12,13,14,15], vômitos [11,12,13,14,15], plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal [2,16], prurido, febre, fraqueza, cefaleia [11,12,13,14,15], tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Essas queixas são geralmente discretas ou moderadas e raramente exigem a suspensão do tratamento [13]. A nefrotoxicidade e distúrbios cardiológicos são efeitos colaterais frequentemente associados ao uso de drogas à base de antimônio [17].

Reações adversas

É provável que se desenvolva tosse grave acompanhada de vômitos. A artrite aguda geralmente envolvendo articulações do pulso, joelho e tornozelos, é uma reação menos comum. Pode ocorrer ocasionalmente bradicardia acentuada, com alterações significativas no eletrocardiograma (ECG) de pacientes tratados

com antimoniais. Estas alterações estão ligadas a sintomas cardiovasculares que normalmente desaparecem de 30 a 60 dias após interrupção do tratamento [18].

A função hepática poderá estar deprimida em pacientes fazendo uso de antimoniais [2]. Estudos clínicos tem evidenciado aumento das enzimas hepáticas. Sendo observados ainda desmaios, dispneia, colapso vascular e erupções brandas [16].

Outros sintomas mais raramente observados são: arritmias fatais ou mortes súbitas [11,19,20], fadiga, dores pelo corpo, pancreatite e anorexia, [11,12,13,14,15].

Ação imunomoduladora do antimoniato

Possuem atividade leishmanicida e ação imunomoduladora pró-inflamatória que pode contribuir para a interrupção da progressão da doença, por aumentar a capacidade fagocítica de monócitos, por cerca de cinco vezes em pacientes tratados, havendo também um aumento na produção de TNF- α [21].

Sistema renina-angiotensina-aldosterona

O sistema-renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um sistema neuroendócrino complexo, responsável pela modulação do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação da pressão arterial. Através das suas múltiplas interações, o SRAA contribui para a proteção do endotélio vascular, e dos tecidos cardíaco, cerebral e renal. Adicionalmente, o SRAA regula a resposta do endotélio à inflamação e lesão. A sua ativação crônica/desregulação induz hipertensão e perpetuação de uma cascata pró-inflamatória, pró-trombótica e aterogênica, que está na base da lesão de vários órgãos-alvo (coração, cérebro, rim, endotélio). Os fármacos que bloqueiam o SRAA em diferentes passos da sua cascata impedem a progressão das doenças cardiovascular e renal [22].

Os principais elementos da cascata são o angiotensinogenio, a renina, a angiotensina I (Ang I), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a angiotensina II (Ang II), como mostra a Figura 3.

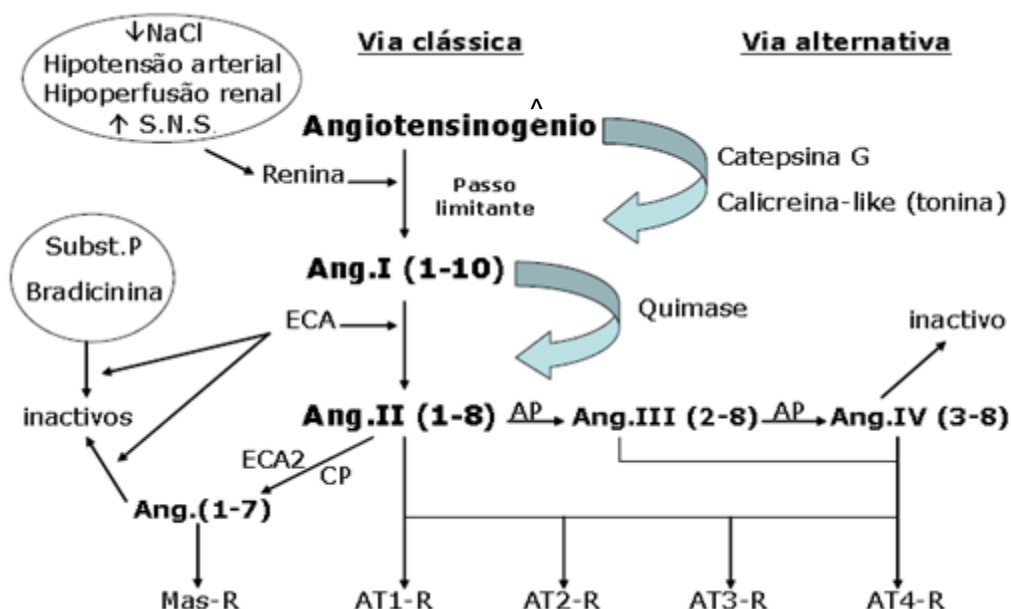


Figura 3 – Sistema-renina-angiotensina-aldosterona [22].

AT1-R – Receptor tipo 1 de angiotensina; AT2-R – Receptor tipo 2 de angiotensina; AT3-R – Receptor tipo 3 de angiotensina; AT4-R – Receptor tipo 4 de angiotensina; AP – Aminopeptidases; CP – Carboxipeptidases; ECA - Enzima conversora de angiotensina; Mas-R – Receptor Mas; NaCl – Cloreto de sódio; S.N.S. – Sistema nervoso simpático; Subst.P – Substância P

A renina regula a etapa limitante do SRAA ao clivar o angiotensinogênio para formar a Ang I inativa. A secreção da renina ativa é regulada principalmente pelos seguintes fatores: reduções da pressão de perfusão ou do conteúdo de NaCl e por aumento da atividade simpática; mecanismo baroreceptor renal na arteríola aferente sensível a alterações da pressão de perfusão renal; estimulação nervosa simpática via receptores adrenérgicos β -1; *feedback* negativo por ação direta da Ang I nas células justaglomerulares [23].

A enzima conversora de angiotensina (ECA) ativa um vasoconstritor potente ao converter a Ang I (10 aminoácidos) em Ang II (8 aminoácidos). Exerce ainda um efeito antivasodilatador ao inativar o sistema das cininas (bradicinina, substância P) [24]. A angiotensina II (Ang II), um octapéptido [Ang (1-8)] biologicamente ativo¹ é clivado em Ang III e IV, pelas aminopeptidases. Existe ainda um heptapéptido [Ang (1-7)] formado a partir da Ang I ou da clivagem da Ang II, por ação de carboxipeptidases, uma das quais possui homologia estrutural com a ECA, designando-se *ECA2*. Ao contrário da ECA, esta enzima leva à formação de péptidos com efeitos predominantemente vasodilatadores,

nomeadamente, a Ang (1-7), a qual atua em receptores específicos (receptor Mas) que exercem uma ação vasodilatadora e cardioprotetora [25].

Os efeitos vasoconstritores da Ang II devem-se à sua ligação aos receptores tipo 1. Dos quatro receptores identificados, os receptores tipo 1 (AT1-R) medeiam a maioria dos efeitos fisiológicos e patofisiológicos atribuídos à Ang.II. A ligação a estes receptores são amplamente distribuídos pelo organismo, e resultam em vasoconstrição, inflamação, stress oxidativo, transcrição de fatores de crescimento responsáveis pela proliferação celular, efeitos cardiovasculares (aterogenicidade; aumento da contractilidade miocárdica; hipertrofia ventricular; remodeling; aumento das arritmias), estimulação da atividade do sistema nervoso simpático (SNS), efeitos renais (aumento da reabsorção de sódio no tubo proximal; inibição da libertação da renina; vasoconstrição arteriolar renal, preferencialmente da arteríola eferente, com conseqüente aumento da taxa de filtração glomerular e redução do fluxo sanguíneo renal), libertação do hormônio antidiurético (ADH) na hipófise posterior, efeitos no córtex da suprarrenal com libertação de aldosterona na zona glomerular e retenção de sódio e água a nível de tubo distal [24, 26].

Os receptores tipo 2 (AT2-R) são abundantes em vários tecidos durante o período fetal, mas o seu número diminui após o nascimento. A ativação destes receptores produz efeitos benéficos, como vasodilatação, antiproliferação (fibroblastos, endotélio, miócitos), melhoria da função cardíaca e diminuição da reabsorção de sódio no tubo proximal [27].

A função dos receptores tipo 3 (AT3-R) não está bem esclarecida, mas os receptores tipo 4 (AT4-R) induzem a libertação do inibidor do ativador de plasminogénio 1 (IAP-1) através da ligação da Ang II e seus péptidos Nterminais (Ang III e IV) [28].

Existe evidência de produção local de Ang II em vários tecidos (cardíaco, renal, encefálico, endotélio vascular, tecido adiposo). A desregulação deste SRAA local também contribui para a patogênese de doenças cardiovasculares e renais [29].

A síntese de Ang II depende em grande parte da renina. A renina circulante converte o angiotensinogénio em Ang I. Na via clássica (figura 3) a ECA é responsável pela conversão de 60% do decapeptido inativo Ang I no octapeptido

ativo Ang II. A conversão dos restantes 40% de Ang II processa-se através de uma via alternativa (Figura 3) pela ação de outras enzimas (quimase, catepsina G e outras proteases serinas) [30].

Inibidores da enzima conversora de angiotensina

Na década de 1960, John R. Vane estava investigando a causa da hipertensão. Concomitantemente, o brasileiro, Sérgio Ferreira, juntou-se ao grupo de Vane e trouxe com ele o fator potenciador da bradicinina (FPB), substância essa obtida do veneno da víbora brasileira *Bothropus jararaca*, já estabelecido anteriormente por Sérgio Ferreira como um potencializador das ações da bradicinina, e esta ação provável por inibir a enzima inativada. Em seguida verificou ser um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA), levando Vane a interessar-se pela ECA e sua inibição, para o tratamento da hipertensão arterial. Em investigações futuras constatou-se ser a ECA um importante regulador da pressão arterial [31].

Nas últimas duas décadas, os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) tem sido usados no tratamento da hipertensão arterial e insuficiência cardíaca congestiva [32].

Os iECA impedem a conversão de angiotensina I (Ang I) para o potente vasoconstritor angiotensina II (Ang II), sendo dessa forma particularmente efetivos no tratamento da hipertensão arterial de pacientes hiperreninêmicos [33].

O captopril, primeiro iECA oralmente ativo, apresenta ação anti-hipertensiva prolongada, sugerindo a existência de concentração tecidual favorável a sua eficácia [34,35]. O captopril é usado para o tratamento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca crônica [35] e miocardite autoimune [22,36].

O enalapril foi o primeiro iECA oralmente ativo, a ser comercializado. As indicações terapêuticas do enalapril são semelhantes às do captopril. Como os demais iECA, o enalapril causa uma diminuição da resistência vascular periférica sem alterar a frequência cardíaca [37].

O enalapril é uma pró-droga (maleato de enalapril) que, após a ação de esterases circulantes e hepáticas, é hidrolisado e liberado o composto ativo, enalaprilato, o qual não é absorvido no trato gastrointestinal. A meia-vida de eliminação inicial ($t^{1/2\alpha}$) é de aproximadamente 5 horas, e a meia vida terminal

($t^{1/2} \beta$) é de cerca de 30 a 35 horas. O volume de distribuição é cerca de 1,7 L/kg. O enalaprilato é eliminado através de secreção tubular e filtração glomerular. Assim, doses reduzidas são indicadas para pacientes com complicações renais. Em pacientes com disfunção hepática, a conversão para a forma ativa, enalaprilato, pode estar diminuída. No entanto, essa biotransformação não é alterada significativamente em pacientes com disfunção hepática [37].

Edema

A disfunção renal leva à diminuição do ritmo de filtração glomerular e também podendo levar a disfunção no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-básico [38]. Nas fases iniciais, quando as manifestações clínicas e laboratoriais são mínimas ou ausentes, o diagnóstico pode ser sugerido pela associação de manifestações inespecíficas (fadiga, anorexia, emagrecimento, prurido, náusea ou hemólise, hipertensão, poliúria, nictúria, hematúria ou edema) [39].

O edema tem por definição como sendo o acúmulo de líquido no espaço intersticial. Ocorre devido à alteração dos mecanismos das forças fisiológicas que controlam a distribuição do volume líquido no espaço intersticial. Os complexos mecanismos formadores de edema em parte podem ser explicados pelo mecanismo fisiopatológico descritos por Starling em 1896. Em síntese, o fluxo dos fluidos, no nível capilar, depende da permeabilidade da parede capilar definida pela constante K_f , e pela diferença entre as variações das pressões hidrostática ($\square P_c$) e da pressão oncótica ($\square \square c$) ao longo do leito capilar, conforme a formula seguinte: Fluxo = $K_f . (\square P_c - \square \square c)$ [40].

Camundongos isogênicos C57BL/6

Animais inbred são também chamados de isogênicos, sendo geneticamente idênticos. Estes animais são obtidos a partir de cruzamentos entre irmãos (endocruzamentos) da mesma geração por, pelo menos, 20 gerações consecutivas em pares monogâmicos permanentes. Isto assegura um alto grau de consanguinidade (inbreeding), cerca de 98,6%, fixando algumas características e perdendo outras. São usados em uma ampla variedade de áreas de pesquisa

incluindo biologia cardiovascular, biologia do desenvolvimento, diabetes e obesidade, pesquisas genéticas, imunológica, neurobiológica e sensorial [41].

JUSTIFICATIVA

Por conduzir à acentuação da resposta normal das células imunocompetentes, a introdução de novos conceitos, enfocando o uso de drogas imunomoduladoras, como por exemplo, o captopril e enalapril, associadas às terapias de algumas doenças, dentre elas a diabetes, leishmaniose e outras doenças, tem sido um importante avanço na redução ou inibição de alguns efeitos colaterais advindo dos medicamentos utilizados. Pesquisadores do mundo todo, tem investigado a eficácia e viabilidade clínica de associação de drogas, em camundongos isogênicos C57BL/6 [42,43,44].

Por ser o antimoníato de meglumina, o medicamento de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, embora ele seja cardiotoxíco e hepatotóxico, vem sendo usado como imunoestimulante em protocolos terapêuticos de doenças que causam imunodepressão. Os efeitos cardiotoxícos são descritos como efeitos diretos [45], como a fibrilação atrial e os efeitos hepatotóxicos descritos em pesquisa realizada por Friedrich (2008), que observou diminuição das atividades de etoxiresorufina-O-desetilase, benziloxiresorufina-O-desbenzilase e eritromicina N-desmetilase nos microsossomos hepáticos em ratos tratados com antimoníato de meglumina [46], elevação dos níveis de TGO, TGP, amilase e lipase [47].

Como o mecanismo de ação de fármacos como o enalapril e o captopril sobre o sistema imune ainda não está elucidado, acredita-se na possibilidade desses medicamentos atuarem de forma benéfica, vindo a reduzir os efeitos colaterais, em pacientes que são administrados o antimoníato de meglumina; diante disso nos propomos no presente trabalho, avaliar a ação da associação desses fármacos sobre os rins e sobre o sistema sanguíneo de camundongos isogênicos C57BL/6.

Embora existam algumas pesquisas sobre a ação imunorreguladora do antimoníato de meglumina, até onde se sabe, ainda não foi descrita a ação desse fármaco sobre a associação dele aos iECA em camundongos isogênicos C57BL/6, eventos que serão abordados nesse trabalho.

HIPÓTESE E OBJETIVO DO TRABALHO

As hipóteses deste trabalho foram:

H0: O uso de inibidores da ECA associado ao antimoniato de meglumina causa menos efeitos renais e alteram o número de células sanguíneas em camundongos isogênicos C57BL/6.

H1: O uso de inibidores da ECA associado ao antimoniato de meglumina não causa menos efeitos renais e não alteram o número de células sanguíneas em camundongos isogênicos C57BL/6.

Com a finalidade de testar as hipóteses mencionadas, o objetivo geral deste trabalho foi estudar os efeitos causados principalmente no rim, como nefrite hemorrágica e modulação no número de células sanguíneas, causadas pela administração de antimoniato de meglumina associado ou não com o captopril ou enalapril. Para tanto, foram realizados ensaios *in vivo* para a determinação de um possível efeito protetor e imunomodulador do captopril e/ou enalapril associados ao antimônio de meglumina, sobre os rins e células sanguíneas de camundongos isogênicos C57BL/6 saudáveis.

Objetivos específicos são: avaliar a ação do antimoniato de meglumina associado ao captopril ou enalapril sobre: lesão tecidual dos rins (análise histológica) e modulação do número de células sanguíneas, em camundongos isogênicos C57BL/6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert opin drug deliv*, v.7, p.1343-1358, 2010.
2. RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R. *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, v.26, n.4, p.550-555, 2003.
3. WILLIAM, L.R.; WALTER, J.M.; PETRIE, M.R. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime) Antimicrob. *Agents Chemotherapy*, v. 42, n.5, p.1076-1082, 1998.
4. JULIANO, V.N.M. Modulação da toxicidade de injetáveis de antimoniato de meglumina através do estudo de desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, Dissertação. 2004. 72p.
5. MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2.ed. Brasília-DF: Editora do Ministério da Saúde; 2007. 182p.
6. LIMONGI, J.P.; CORBETT, C.E. Em Farmacodinâmica. 4.ed. São Paulo – SP: Editora Livraria Editora Artes Médicas; 1973. p.845-850.
7. SERENO, D.; HOZMULLER, P.; MANGOT, I.; *et al.* Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial Agents Chemother*, v.45, p.2064-2069, 2001.
8. ROBERTS, W.L.; BERMAN, J.D.; RAINEY, P.M. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrobial Agents Chemother*, v.39, p.1234-1239, 1995.
9. BORBOREMA, S.E.T.; OSSO JR.; J.A.; ANDRADE JR.; H.F.; NASCIMENTO, N. Biodistribution of meglumine antimoniate in healthy and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*-infected BALB/c mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.108, n.5, p.623-630, 2013.
10. GOODWIN, L.G.; PAGE J.E.J.E. A study of the excretion of arganic antimonials using a polarographic procedure. *Biochemistry*, v.22, p.236-240, 1943.
11. AMATO, V.S.; ANDRADE JR, H.F.; DUARTE, M.I.S. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Tropica*, v.85, p.39-49, 2003.
12. HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet*, v.354, p.1191-1199, 1999.
13. MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.18, p.187-198, 1985.
14. RAMOS-E-SILVA, M.; JACQUES, C.M.C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. *Clinics in Dermatology*, v.20, p.122-134, 2002.
15. SAMPAIO, R.N.R.; DE PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, J.H.D. *et al.* Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do antimonial pentavalente administrado na dose de

- 40mg sbv/kg/dia, de 12/12h, por 30 dias na forma cutâneo-mucosa de leishmaniose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.30, n.6, p.457-463, 1997.
16. ALKHAWAJAH, A. Recent trends in the treatment of CL. *Annals of Saudi Medicine*, v.18, p.412–416, 1998.
17. BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, J.C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, v.30, 435-443, 1998.
18. GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1983. p.900-9002.
19. AMATO, V.S.; OLIVEIRA, L.S.; SILVA, A.C.M. Um caso de leishmaniose cutâneo-mucosa tratado com sucesso com baixa dose de antimonial pentavalente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.31, p.221-224, 1998.
20. LAGUNA-TORRES, V.A.; SILVA, C.A.C.; CORREIA, D. *et al.* Mefloquina no tratamento da leishmaniose cutânea em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, p.529-532, 1999.
21. DE SALDANHA, R.R.; MARTINS-PAPA, M.C.; SAMPAIO, R.N.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, v.106, n.10, p.596-603, 2012.
22. GIESTAS, A.; PALMA, I.; RAMOS, M.H. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e sua modulação farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, v.23, p.677-688, 2010.
23. BROWN, M.J. Direct renin inhibition – a new way of targeting the renin system. *Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006;7(suppl 2):S7-S11 APUD Anabela GIESTAS, Isabel PALMA, Maria Helena RAMOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINAALDOSTERONA E sua Modulação Farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, v. 23, p.677-688, 2010.
24. CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003;24:261-271 APUD Anabela GIESTAS, Isabel PALMA, Maria Helena RAMOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINAALDOSTERONA E sua Modulação Farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, v. 23, p.677-688, 2010.
25. REUDELHUBER, T.L. The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:155-9 APUD Anabela GIESTAS, Isabel PALMA, Maria Helena RAMOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINAALDOSTERONA E sua Modulação Farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, v. 23, p.677-688, 2010.

26. FERRARIO, C.M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease: Therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006;7:3-14 APUD Anabela GIESTAS, Isabel PALMA, Maria Helena RAMOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINAALDOSTERONA E sua Modulação Farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, v. 23, p.677-688, 2010.
27. HERNADEZ SCHULMAN, I.; ZHOU, M.S.; RAIJ, L. Cross-talk between angiotensin II receptor types 1 and 2: Potential role in vascular remodeling in humans. *Hypertension* 2007;49:270-1 APUD Anabela GIESTAS, Isabel PALMA, Maria Helena RAMOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINAALDOSTERONA E sua Modulação Farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, v. 23, p.677-688, 2010.
28. STANTON, A. Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003;3:389-94 APUD Anabela GIESTAS, Isabel PALMA, Maria Helena RAMOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINAALDOSTERONA E sua Modulação Farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, v. 23, p.677-688, 2010.
29. PAGLIARO, P.; PENNA, C. Rethinking the renin-angiotensin system and its role in cardiovascular regulation. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005;19:77-87 APUD Anabela GIESTAS, Isabel PALMA, Maria Helena RAMOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINAALDOSTERONA E sua Modulação Farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, v. 23, p.677-688, 2010.
30. HOLLENBERG, N.K.; FISHER, N.D.; PRICE, D.A. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 1998;32:387-392 APUD Anabela GIESTAS, Isabel PALMA, Maria Helena RAMOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINAALDOSTERONA E sua Modulação Farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, v. 23, p.677-688, 2010.
31. SMITH, C.G.; VANE, JR. The discovery of captopril. *Faseb Journal*, v.17, n.8, p.788-789, 2003.
32. ARAKAWA, K. Serine protease angiotensin system. *Journal of Hypertension*, v.14 (Suppl 5):3s-7s. 1996.
33. ANTONACCIO, M.J. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 22, p.57-87, 1982.
34. VERTES, V.; HAYNIE, R. Comparative pharmacokinetics of captopril, enalapril and quinapril. *American Journal of Cardiology*, v.69, p.8c-16c. 1992.
35. BELZ, G.G.; KIRCH, W.; KLEINBLOESEM, CH. Angiotensin converting enzyme inhibitors. Relationship between pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, v.15, p.295-318, 1988.
36. GODSEL, L.M.; LEON, J.S.; WANG, K. *et al.* Captopril prevents experimental autoimmune myocarditis. *The Journal of Immunology*, v.171, n.1, p.346-352, 2003.

37. TODD, P.A.; HEEL, R.C. Enalapril: A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetics, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs*, v.31, p.198-248, 1986.
38. YU L, ABENSUR H, BARROS, E.J.G. HOMSI, E. *et al.* Insuficiência renal aguda. Conceito, diagnóstico, prevenção e tratamento da insuficiência renal aguda. *Sociedade Brasileira de Neurocirurgia*, p. 1-6, 2001.
39. CARPENITO LJ. Plano de cuidados e documentação. *Artes Médicas*, p. 619-23, 1999.
40. STARLING, EH. Physiologic forces involved in the causation of dropsy. *Lancet* v. 1, p.1267-1270, 1896.
41. SOARES, M.B.P.; CARVALHO, L.C.P.; SANTOS, R.R. Banco de Embriões de Camundongos geneticamente modificados. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.20, p.50-53, 2001.
42. RICE, A.D.; TURNER, P.C.; EMBURY, J.E. *et al.* Roles of vaccinia virus genes E3L and K3L and Host genes PKR and RNase L during intratracheal infection of C57BL/6 mice. *Journal of Virology*, v.85, n.1, p.550-567, 2011.
43. INGRAO, J.C.; JOHNSON, R.; TOR, E. *et al.* Aqueous stability and oral pharmacokinetics of meloxicam and carprofen in male C57BL/6 mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v.52, n.5, p.553-559, 2013.
44. PEREIRA, A.; SUGIHARTO-WINARNO, A.; ZHANG, B.; *et al.* Clozapine induction of ERK1/2 cell signaling via the EGF receptor in mouse prefrontal cortex and striatum is distinct from other antipsychotic drugs. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v.15, p.1149-1160, 2012.
45. SCHVARTSMAN, S. Intoxicações Agudas, Ed. Sarvier, 3ª ed., São Paulo, 1985. p.232-233.
46. FRIEDRICH, K. Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromos P450 hepáticos em primatas e ratos tratados com antimoniato de meglumina. Rio de Janeiro: s.n., Tese de Doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. 2008. 162p.
47. DEPS, P.D.; VIANA, M.C.; FALQUETO, A.; DIETZE, R. Avaliação comparativo da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do Estibobluconato de Sódio BP88 no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, n.6, p.535-543, 2000.

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

[Enalapril and captopril reverse edema and renal hyperplasia caused by N-methylglucamine antimonate in C57BL6 mice]

No Brasil e nos demais países de língua portuguesa, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), um antimonial pentavalente (Sb^{+5}), é a droga de primeira linha para o tratamento das leishmanioses [1]. As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que podem ocorrer na pele, nas membranas mucosas ou nas vísceras. Embora o antimoniato de N-metilglucamina tenha sido introduzido em 1945 e ainda seja a droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses [2], o índice de sucesso terapêutico, usando o esquema preconizado pelo Ministério da Saúde, varia de 26% a 91,4% [3]. Além disso, o uso de antimoniato de N-metilglucamina está associado a efeitos adversos como, por exemplo, artralgia, cefaléia, reações cutâneas, mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas, cardiológicas e renais [4].

No que tange aos efeitos adversos do antimoniato de N-metilglucamina, postula-se que a cardiotoxicidade seria o seu efeito adverso mais severo. Todavia, a literatura mostra que os efeitos tóxicos do antimoniato de N-metilglucamina sobre os rins podem ser severos, levando inclusive os pacientes a óbito [5]. A elevada toxicidade e as variações no índice de sucesso terapêutico tornam o tratamento das leishmanioses com antimoniato de N-metilglucamina um desafio para o sistema único de saúde (SUS), inclusive com aumento de custos para os cofres públicos e geração de sofrimento para o paciente. Assim, as adversidades decorrentes do uso do antimoniato de N-metilglucamina tem impulsionado a realização de pesquisas na perspectiva de se obter um cenário mais promissor. Entre as alternativas terapêuticas de se reverter ou amenizar a cardiotoxicidade e a renotoxicidade do antimoniato de N-metilglucamina, sobressaem-se os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), como o captopril e o enalapril. Nesse sentido, foi verificado, em um estudo retrospectivo, que a administração concomitante de antimoniato de N-metilglucamina e inibidores da ECA, entre eles o captopril e o enalapril, parece corrigir a

cardiotoxicidade causada pelo antimoniato de N-metilglucamina [6]. Já está bem estabelecido que o enalapril e o captopril além de serem anti-hipertensivos, são também anti-inflamatórios e imunoreguladores [7]. Em um trabalho anterior, nós mostramos que o captopril reduz a nefrite no modelo murino BW [F1], predisposto ao desenvolvimento de lúpus [8]. Embora antimoniato de N-metilglucamina seja tóxico para os rins de humanos [9] e de ratos, [10], até onde se sabe, não há registros na literatura de estudos pré-clínicos avaliando o efeito do captopril ou enalapril sobre as lesões renais causadas pelo antimoniato de N-metilglucamina em camundongos. Portanto, no presente estudo avaliou-se o possível efeito do captopril e do enalapril sobre os efeitos do antimoniato de N-metilglucamina em rins de camundongos e verificou-se que tanto o enalapril quanto o captopril reverte o edema e a hiperplasia renais causados pelo antimoniato de N-metilglucamina.

Animais: Os camundongos da linhagem C57BL/6, isogênicos, usados nesse experimento eram todas fêmeas, estavam com idade de 12 semanas no início do experimento e foram adquiridas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, BA. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com acesso livre a água e ração autoclavadas, com ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas e temperatura a 25°C. A manipulação dos animais foi feita de acordo com os princípios de ética da experimentação animal (# 23108.039341/12-4).

Grupos: Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com 10 animais por grupo, como segue: Grupo 1: Recebeu salina a 0,9% por via intramuscular por 30 dias e foram deixados sem outro tratamento, servindo de controle; Grupo 2: Recebeu antimoniato de N-metilglucamina (100 mg Sb⁺⁵/kg) por via intramuscular; Grupo 3: Recebeu antimoniato de N-metilglucamina como o grupo 2 e foi tratado com captopril; Grupo 4: Recebeu o antimoniato de N-metilglucamina como o grupo 2 e foi tratado com enalapril.

Medicamentos e tratamento: O captopril (Captotec®) e o enalapril (Enaprotec®) foram obtidos comercialmente (Hexal Laboratoty, São Paulo, SP, Brasil). O

captopril e o enalapril foram dissolvidos em água potável autoclavada, na concentração de 0,12 mg/mL para o captopril e 0,02 mg/mL para o enalapril. Os medicamentos dissolvidos em água potável foram oferecidos *ad libitum* e a dosagem diária foi de 30 mg/kg de peso corporal para o captopril e de 5 mg/kg para enalapril, assumindo uma ingestão diária de 5 mL de água por animal. A dose do captopril foi previamente estabelecida para manter a pressão arterial normal [8]. Já a dose do enalapril está dentro das margens das doses desse medicamento normalmente usado para o tratamento oral de camundongos [8, 11]. Além disso, a administração desses medicamentos por via oral e oferecidos *ad libitum*, está bem estabelecida na literatura pertinente [11]. Os medicamentos dissolvidos em água potável autoclavada foram repostos a cada 24 horas e o tratamento foi realizado durante um mês sem interrupção. O antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®; Sanofi-Aventis, São Paulo, SP, Brasil) foi cedido pela Professora Dra. Márcia Hueb, do Hospital Universitário Julio Muller da UFMT. Cada ampola de 5 mL Glucantime® continha 1,5 g de antimoniato bruto, o equivalente a 405 mg de antimônio pentavalente (Sb^{+5}) ou 81 mg/mL de Sb^{5+} . A dose do antimoniato de N-metilglucamina usado nesse trabalho está descrita na literatura pertinente [12].

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

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

Resultados: Os resultados expressos na Tabela 1 e na Figura 4 mostram que os rins dos animais tratados com antimoniato de N-metilglucamina apresentavam

edema, hiperplasia nucleolar dos podócitos e hiperplasia nucleolar das células epiteliais nos túbulos contorcidos proximais. Os resultados também mostram que o enalapril reverteu completamente o edema e a hiperplasia nucleolar dos podócitos das células epiteliais nos túbulos contorcidos proximais causados pelo antimoníato de N-metilglucamina (Tabela 1 e Figura 4). Por outro lado, os animais que receberam antimoníato de N-metilglucamina e foram tratados com captopril ainda apresentavam um pequeno edema renal comparado ao controle (Tabela 1 e Figura 4). Os mecanismos pelos quais o enalapril e o captopril revertem às lesões renais causadas pelo antimoníato de N-metilglucamina não foram estudados no presente trabalho. Entretanto, pode-se especular que esses medicamentos podem ter inibido a síntese de biomoléculas inflamatórias, já que eles são reconhecidamente drogas anti-inflamatórias.

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

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

¹Hiperplasia nucleolar dos podócitos; ²Hiperplasia nucleolar das células epiteliais nos túbulos contorcidos proximais. ***, p < 0,01 para antimoníato de N-metilglucamina *versus* Controle; ###, p < 0,01 para antimoníato de N-metilglucamina *versus* captopril ou enalapril. AM, antimoníato de N-metilglucamina; CP, captopril; EP, enalapril.

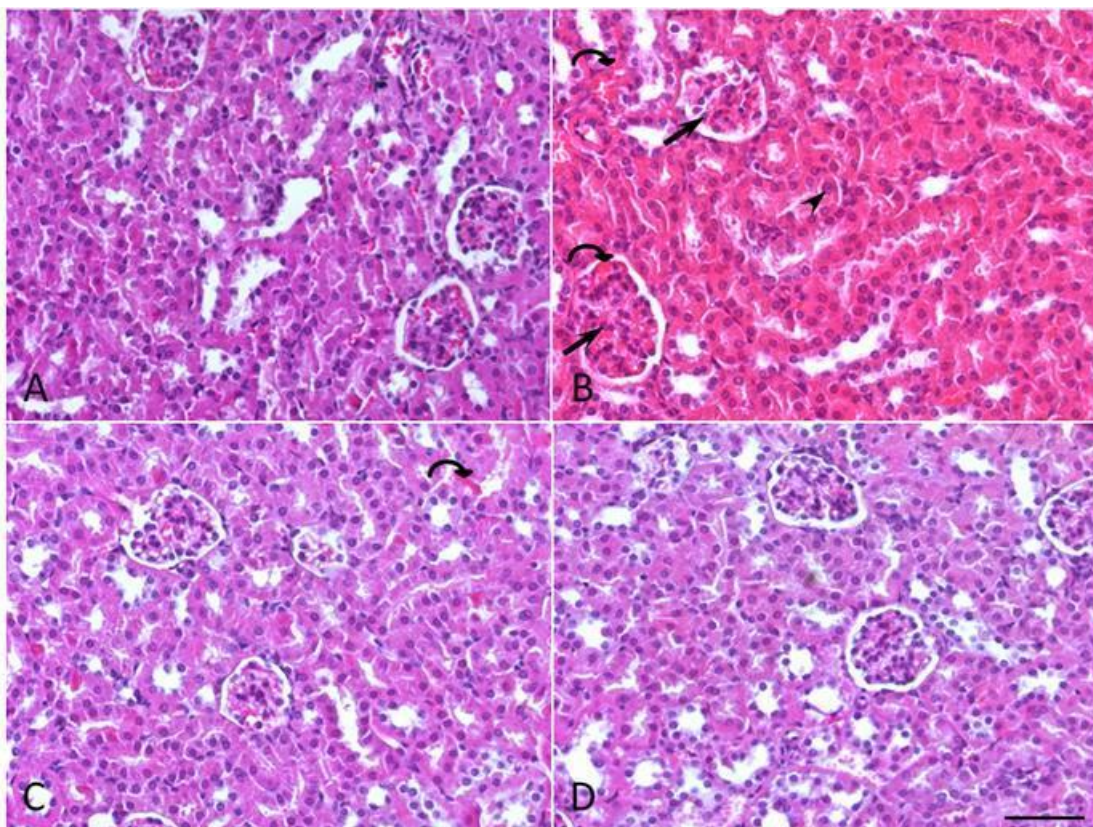


Figura 4. Análise histopatológica dos rins de camundongos C57BL/6

No final do experimento, os animais foram sacrificados e biopsias dos rins foram analisadas. (A) Grupo controle evidenciando morfologia normal da região cortical do rim. (B) Grupo tratado com antimoniato de N-metilglucamina apresentando hiperplasia nuclear dos podócitos (setas) e das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais (cabeças de setas) e edema (seta curva). (C) Grupo tratado com antimoniato de N-metilglucamina e captopril evidenciando pequeno edema (seta curva). (D) Grupo tratado com antimoniato de N-metilglucamina e enalapril evidenciando morfologia normal. Coloração HE. Barra = 100 μ m.

A partir dos resultados pode-se concluir que o enalapril e o captopril revertem o edema e a hiperplasia causados pelo antimoniato de N-metilglucamina em camundongos C57BL/6.

Palavras-chave: inibidores da enzima conversora de angiotensina, glucantime[®], renotoxicidade

AGRADECIMENTOS

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

ABSTRACT

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

Key-words: enzyme-converting inhibitors, glucantime, renotoxicidade

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1.ed. Brasília: DF, 2014. 122p.
2. FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert opin drug deliv*, v.7, p.1343-1358, 2010.
3. LIMA, E.B.; MOTTA, J.O.C.; PORTO, C.; SAMPAIO, R.N.R. Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiro de dermatologia*, v.82, n.2, p.111-124, 2007.
4. RODRIGUES, A.M.; HUEB, M.; NERY, A.F.; FONTES, C.J.F. Possible cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors during

treatment of American tegumentar leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Acta Tropica*.v.102, n.2, p.113-118, 2007.

5. AMATO, V.S.; OLIVEIRA, L.S.; SILVA, A.C.M. Um caso de leishmaniose cutâneo-mucosa tratado com sucesso com baixa dose de antimonial pentavalente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.31, p.221-224, 1998.

6. RODRIGUES, A.M.; HUEB, M.; NERY, A.F.; FONTES, C.J.F. (2007) Possible cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors during treatment of American tegumentar leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Acta Tropica*. 102(2):113-118.

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

8. ALBUQUERQUE, D.A.; SAXENA, V.; ADAMS, D.E. et al. An ACE inhibitor reduces Th2 cytokines and TGF-beta1 and TGF-beta2 isoforms in murine lupus nephritis. *Kidney International*, v.65, n.3, p.846-859, 2004.

9. SAMPAIO, R.N.R.; DE PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, J.H.D. et al. Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do antimonial pentavalente administrado na dose de 40mg sbv/kg/dia, de 12/12h, por 30 dias na forma cutâneo-mucosa de leishmaniose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.30, n.6, p.457-463, 1997.

10. VEIGA, J.P.R.; KHANAM, R.; ROSA, T.T.; JUNQUEIRA JR, L.F. et al. Pentavalent antimonial nephrotoxicity in the rat. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v.32, n.4, p.304-309, 1990.

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

12. SANTOS, M.R.; KRIGNL, C.J.; NAVA, A. et al. Avaliação do efeito cumulativo do antimoniato de meglumina sobre a prole de camundongos Swiss: ensaio biológico. *Revista da Associação Médica Brasileira*,v.54, n.1, p.13-16, 2008.

Estudo comparativo entre captopril e enalapril sobre os leucócitos periféricos e células da medula óssea em camundongos C57BL/6, tratados com antimoniato de meglumina

[Comparing the effect of captopril and enalapril on the count of peripheral white blood cells and bone marrow cells in meglumine antimoniate-treated C57BL/6 mice]

RESUMO

Os compostos antimoniais são usados desde 1940 para tratamento de leishmanioses. Apresentam efeitos sobre as células sanguíneas, são cardiotoxícos, hepatotóxicos e nefrotóxicos, sendo assim, a associação com inibidores da enzima conversora de angiotensina pode ser benéfico. Objetivou-se comparar os camundongos tratados com antimoniato de meglumina em associação aos inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) - o captopril e o enalapril, destacando a importância em conhecer suas ações sobre a contagem de leucócitos totais do sangue periférico e a células da medula óssea. Os camundongos foram divididos em grupos com 10 animais cada, como segue: Grupo 1 - recebeu salina por via intramuscular (IM); Grupo 2 - recebeu antimoniato de meglumina (IM); Grupo 3 - tratado com antimoniato de meglumina e captopril; Grupo 4 - tratado com antimoniato de meglumina e enalapril. Ambos, captopril e enalapril, foram administrados por via oral em água potável *ad libitum*. Após 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e avaliados os leucócitos totais do sangue periférico e as células da medula óssea. Os leucócitos totais do sangue periférico não foram alterados com os tratamentos. Já o tratamento com enalapril, aumentou o número total de células da medula óssea, quando em comparação ao controle. Nas condições experimentais, a associação do antimoniato de meglumina com enalapril, mostrou ter ação reguladora no número de células da medula óssea.

Palavras-chave: associação de medicamentos, glucantime[®], iECA

ABSTRACT

Introduction: The objective of this study was to compare the effect of the treatment with meglumine antimoniate in association with ACEI, on the count of total peripheral blood leukocytes and bone marrow cells. **Methods:** The mice were divided, and categorized as follows: G1- receiving saline intramuscular (IM); G2- receiving meglumine antimoniate (IM); G3- treated with meglumine antimoniate and captopril; G4- treated with meglumine antimoniate and enalapril. **Result:** The treatment with enalapril increased the total number of bone marrow cells. **Conclusion:** The association with enalapril was shown to have a regulatory effect on the number of bone marrow cells.

Keywords: Combination of drugs, glucantime, angiotensin-converting enzyme inhibitors

Antimony compounds such as N-methyl glucamine (whose trade name is meglumine antimoniate) have been used since the 1940s and are recommended by the World Health Organization as the first choice for the treatment of diseases caused by the protozoa of the genus *Leishmania* [1].

When only antimony compounds are used for the treatment, the symptoms of leishmaniasis, such as ulcers, might still appear. In addition, these drugs are cardiotoxic, hepatotoxic, and nephrotoxic. According to Neves et al. [2], this justifies the need to recommend specific treatment based on medications that modulate the immune response or protect the organs that could be damaged. Moreover, the development of species that resist medication, high rate of therapeutic failure, and long duration of the disease suggest need for an alternative therapy associated with the standard treatment with meglumine antimoniate⁽²⁾. Given these assumptions, we compared the laboratory data on the count of white blood cells and bone marrow cells, referring to the combination of angiotensin-converting enzyme inhibitors ACEIs with meglumine antimoniate in healthy mice, so that this information can be used in other experiments.

Captopril and enalapril were chosen due to their immunomodulatory properties. Tarkowski et al. [3] strongly suggested that captopril, an ACEI, has an immunomodulatory effect in diseases such as lupus in mice, stimulating T cell lymphocytes [4]. Charrier et al. [5] carried out a study demonstrating the hematoprotective effects of ACEIs. Several studies reported that the effects of angiotensin-converting enzymes (ACE) are not limited to their cardiovascular function, since the enzymes seem also to be involved in the regulation of hematopoietic proliferation [5]. In view of these studies, the use of ACEIs is recommended in combination with meglumine antimoniate, so that it can contribute to regulate the immune system.

Therefore, it is important to assess the effects due to the association of captopril or enalapril with meglumine antimoniate on leukocytes and bone marrow cells count. This study is being performed to consolidate the knowledge on the potential effect of the combination of these drugs on blood cells. The evaluation of

blood and bone marrow is an important component in any toxicity assessment and a safety indicator of the study [6].

It was shown that meglumine antimoniate is capable of inducing a cellular immune response in patients undergoing this treatment, by increasing the amount of T cells and activated macrophages. Therapeutic failure in immunosuppressed patients is one of the factors that encourages seeking the ideal medication [2].

Female C57BL/6 mice used, in this study, were purchased from the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), in Salvador, state of Bahia. These mice were chosen since they represent the closest experimental model to humans, in relation to the response or manifestation of cutaneous leishmaniasis. The animals were kept in polypropylene cages, at a constant temperature of 25°C, with 12/12h light-dark cycles, and *ad libitum* access to feed and water sterilized by autoclaving. Before initiating the experimental protocol, the animals were allowed to spent 30 days to adapt to the conditions of the research facility. At the beginning of the experiment, the animals were 8 weeks old and weighed an average of 20 g each. We used a total of 40 mice. The experiment was started after the approval of the Animal Research Ethics Committee of UFMT under protocol no. 23108.039341/12-4 and experiments were conducted in compliance with international animal protection regulations and ethical principles of animal experimentation of the Brazilian Committee of Animal Experimentation.

The animals were randomly divided into 4 groups, as described below: Group 1 (control group): received 0.9% saline, applied via intramuscular (IM) injection for 30 days and did not receive any other treatment; Group 2 (Meg group): received meglumine antimoniate via IM injection at 100 mg Sb^v/kg body weight/day, at a dose equivalent to the therapeutic one [7]; Group 3 (Cp + Meg group) received meglumine antimoniate as Group 2 and was treated with captopril dissolved in drinking water, at a dose of 30 mg/kg/day/5 ml water *ad libitum*; Group 4 (Ep+Meg group): received meglumine antimoniate as Group 2 and was treated with enalapril dissolved in drinking water, at a dose of 5 mg/kg/day/5 ml water *ad libitum*. The daily dosage was 30 mg/kg body weight of captopril and 5 mg/kg body weight of enalapril, assuming 5 mL *ad libitum* daily fluid intake per animal. These dosages are within the usual therapeutic standards used for mice [4].

Captopril (Captotec® 50 mg) and enalapril (Enaprotec® 10 mg) were purchased from the Hexal Laboratory [São Paulo (SP), Brazil]. Meglumine antimoniate (Glucantime®) from the Sanofi-Aventis laboratory [São Paulo (SP), Brazil] was provided by the Júlio Müller University Hospital of UFMT. Captopril and enalapril were prepared every 24 hours and adjusted according to the daily weight of the animals, by dissolving in autoclaved drinking water at a concentration of 0.2 and 0.02 mg/ml, respectively. Each 5 ml vial contained 1.5 g of antimoniate, which is equivalent to 405 mg of pentavalent antimony (Sb^{+5}) or 81 mg/ml Sb^{+5} .

The consumption of water was registered daily. After 30 days of treatment, the blood was collected from 40 mice, by the retro-orbital route with the aid of glass Pasteur pipettes. In order to count the total white blood cells, a 10 μL sample of fresh blood was collected and placed in conical propylene tubes, followed by the addition of 190 μL Turk's solution. The tube with the fresh blood diluted at 1:20 in Turk's solution was then homogenized with a pipette, to fill a Neubauer chamber. Total white blood cells were counted under a light microscope, using 40x objective lenses. The counting was performed within 4 hours of the sample preparation. The count was obtained as: white blood cells $\times 10^6$ cells/mL.

On the 30th day of the treatment, after blood collection, the animals underwent assisted euthanasia and the bone marrow was collected from the right femur of each mouse. The content of the bone marrow was cleaned with 5.0 mL PBS (phosphate-saline buffer), to which 3 ml of incomplete medium (RPMI 1640, Sigma Chemical Co., St Louis, USA) was added, macerated and then stored in 10 ml polypropylene cone-shaped tubes, placed in ice bath. The bone marrow suspension was centrifuged and the supernatant was discarded. The resulting material was homogenized and a 10 μL sample aliquot was diluted in Turk's solution, for further cell count.

A sample of the bone marrow cell suspension was diluted 40 times in the Turk's solution. The cells were counted in a Neubauer chamber, under a light microscope using 40x objective lenses. The result was expressed as bone marrow cells $\times 10^6$ /mL.

With the data obtained from the white blood cell count and the bone marrow cells, variance homogeneity and distribution normality tests were carried out. Due to the absence of a normal distribution, as indicated by the test, the differences

between groups were assessed using the Kruskal-Wallis nonparametric test. When the result was significant, Dunn's test was used for the comparison of the averages. The adopted significance level was 5% ($p < 0.05$).

Ingestion of the medication was controlled and the following results on average consumption were obtained per group/day: 47.2 (control group), 53.6 (Meg group), 47.9 (Cp+Meg group), and 51.8 (Ep+Meg group). There was no difference in consumption between the Cp+Meg and Ep+Meg groups when compared with that of the control group.

Table 1 shows the averages and standard deviations obtained from the total leukocytes count in the peripheral blood and bone marrow cells for each group ($n=10$). The treatment with meglumine antimoniate and the treatments combined with captopril and enalapril did not affect the number of total peripheral leukocytes. Regarding the bone marrow cells (Table 2), an increase in their number could be observed in the group treated with meglumine antimoniate and enalapril, when compared to the control group. However, the group treated with captopril and meglumine antimoniate showed similar results as that of the control group, and therefore no differences were observed. Since we detected cell changes in the bone marrow, the work followed Car's [8] recommendations, according to whom the comparison should be performed at the same time as the blood cell count, whenever possible.

Even though captopril and enalapril are used as hypertensives, their chemical formulation (captopril containing sulfhydryl radical and enalapril containing carboxyl radical) might be one of the factors that contributed to differences in the experimental results. This could also be due to the catalytic activity during the chemical reactions of the drugs administered to the animals.

Table 2. Number of total white blood cells in peripheral blood and bone marrow of C57BL/6 mice that received saline, meglumine antimoniate, meglumine antimoniate and captopril, and meglumine antimoniate combined with enalapril

Bone Marrow							
Treatment	Minimum	Maximum	Mean	Median	CI	Standard Deviation	CV%
Control	1.3	20	9 ^c	8	±5.2	7.0	79
Meg	1.2	43	26 ^b	29	±5.0	16.0	60
Cp+Meg	0.9	28	12 ^c	12	±6.4	9.0	73
Ep+Meg	18.6	69	47 ^a	52	±8.0	21.0	45

Total white blood cells in peripheral blood							
Treatment	Minimum	Maximum	Mean	Median	CI	Standard Deviation	CV%
Control	0.5	6.4	3.0 ^a	2.4	±1.7	2.4	80
Meg	1.0	5.3	3.5 ^a	3.6	±0.9	1.4	40
Cp+Meg	0.8	8.7	3.2 ^a	2.5	±1.7	2.4	76
Ep+Meg	0.5	5.6	2.3 ^a	2.0	±1.56	1.9	80

Mean ± standard deviation of the number of total white blood cells in peripheral blood and bone marrow. Numbers followed by the same letter in the same column do not differ at 5% probability according to the Kruskal-Wallis test. Meg – Meglumine Antimoniate; Cp – captopril; Ep – enalapril.

However, the lack of studies in the literature assessing the effects of treatments based on combined medications and certain bone marrow diseases show the need to carry out further investigations, using peripheral blood and bone marrow cells to monitor the therapeutic effects of the medication in *in vivo* studies. Nevertheless, bone marrow cells are the progenitors of components found in vertebrates, such as bones, stroma, cartilage, hematopoietic stem cells, and adipocytes. Chisi et al. [9] performed studies that showed that in animals subjected to chemotherapy, the use of ACEIs resulted in a decreased number of granulocyte and macrophage progenitor cells in the bone marrow. It also diminished the recovery time of the bone marrow microenvironment. Similarly, Charrier et al.[5] also observed a decrease in the hematopoietic toxicity caused by irradiation in mouse models.

Studies on the cardio, hepato, and nephroprotective effects are being performed to verify whether the combination of ACEIs and meglumine antimoniate is beneficial. The findings of this study suggest that the total number of white blood

cells in the peripheral blood did not change after the treatments were conducted under the proposed experimental conditions. The resulting data demonstrated that, mice treated with enalapril for 30 days presented a higher count of bone marrow cells than that of the mice subjected to other treatments. There was no difference between the number of bone marrow cells in the group treated with captopril and the control group. Further studies are necessary to reach a conclusion regarding the effects of treatment with a combination of meglumine antimoniate and ACEIs on the immune response. Future research work using flow cytometry to investigate the potential long-term negative implications of this drug combination are recommended.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the National Counsel of Technological and Scientific Development - CNPq (# 471234/2011-7).

REFERENCES

1. COELHO, D.R.; MIRANDA, E.S.; SAINT'PIERRE, T.D.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Tissue distribution of residual antimony in rats treated with multiple doses of meglumine antimoniate. *Memória Instituto Oswaldo Cruz*, v.109, v.4, p.420-427, 2014.
2. NEVES, L.O.; GADELHA, E.P.N.; GUERRA, J.A.O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.86, n.6, p.1092-1101, 2011.
3. TARKOWSKI, A.; CARLSTEN, H.; HERLITZ, H.; WESTBERG, G. Differential effects of captopril and enalapril, two angiotensin converting enzyme inhibitors, on immune reactivity in experimental lupus disease. *Agents and Action*, v.31, n.1-2, p.96-101, 1990.
4. ALBUQUERQUE, D.; NIHEI, J.; CARDILLO, F.; SINGH, R. The ACE inhibitors enalapril and captopril modulate cytokine responses in Balb/c and C57Bl/6 normal mice and increase CD4+CD103+CD25- splenic T cell numbers. *Cellular Immunology*, v.260, p.92-97, 2010.
5. CHARRIER, S.; MICHAUD, A.; BADAoui, S. et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells. *Blood*, v.104, n.4, p.978-985, 2004.

6. TRAVLOS, G.S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicologic Pathology*, v.5, p.548-565, 2006.
7. SANTOS, M.R.; KRIGNL, C.J.; NAVA, A. et al. Avaliação do efeito cumulativo do antimoniato de meglumina sobre a prole de camundongos swiss: ensaio biológico. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.54, n.1, p.13-16, 2008.
8. CAR, BD. The hematopoietic system. In: WEISS DJ, WARDROP KJ. *Shalm's Veterinary Hematology*. ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2010. p.27-35.
9. CHISI, J.E.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; THIERRY, J. et al. Captopril Inhibits the Proliferation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Murine Long-Term Bone Marrow Cultures. *Stem Cells*, v.17, p.339-344, 1999.



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.039341/12-4, sobre “Efeitos de antimoniato de meglumina versus inibidores da enzima conversora de angiotensina II”, sob a responsabilidade de **Profª. Drª DEIJANIRA ALVES ALBUQUERQUE; SUIZE SILVA OLIVEIRA & Colaboradores** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de laboratório (SBCAL), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **22/11/2012**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.039341/12-4, entitled "Effects of meglumine antimoniate and angiotensin converting enzyme II inhibitors", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Animals of Laboratory (SBCAL). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Nov 22, 2012**.

Cuiabá-MT, 23 de novembro de 2012.

Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente

Profª Drª Nair Honda Kawashita
Vice-Presidente

**FUNDAÇÃO ESTUDO PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA
FEP MVZ EDITORA
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

CNPJ: 16.629.388/0001-24 Insc. Municipal: 302856.001-3
Av. Antônio Carlos, 6627 - Caixa Postal 567 - 30123-970 Belo Horizonte MG
Fone: (31) 3409-2042 Fax: (31) 3409-2041
<http://www.abmvz.org.br> E-mail: abmvz.artigo@abmvz.org.br

Prezado(s) Sr.(s): Suize Silva Oliveira, Leticya Lerner Lopes, Amílcar Sabino Damazo, Deijanira Alves de Albuquerque,
Informamos a V. Sa. que o trabalho abaixo relacionado foi RECOMENDADO para publicação no Arquivo Brasileiro de
Medicina Veterinária e Zootecnia.

Código/Ano: **892S/2015**

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

Outros procedimentos serão informados oportunamente.

Atenciosamente,



Prof. Antônio de Pinho Marques Jr.
Editor Chefe
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Resultados obtidos durante a pesquisa que não constam nos artigos apresentados no texto principal:

Tabela 1A. Análise descritiva do consumo de ração (g) e ingestão de água (mL)

	Mínimo	Máximo	Amplitude	Media	Desvio Padrão	CV%
Consumo de ração (g)						
Salina	17,0	33,0	16,0	27,8ab	3,1	11
Meg	18,0	39,0	21,0	30,2a	3,8	12
Cp+Meg	20,0	32,0	12,0	26,4b	3,0	11
Ep+Meg	20,0	37,0	17,0	28,0ab	3,3	12
Ingestão de água (mL)						
Salina	17,0	72,0	55,0	47,2b	9,1	19
Meg	16,0	82,0	66,0	53,6a	10,1	19
Cp+Meg	25,0	62,0	37,0	47,9b	6,6	14
Ep+Meg	14,0	75,0	61,0	51,8ab	9,9	19

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
CV% = Coeficiente de variação.

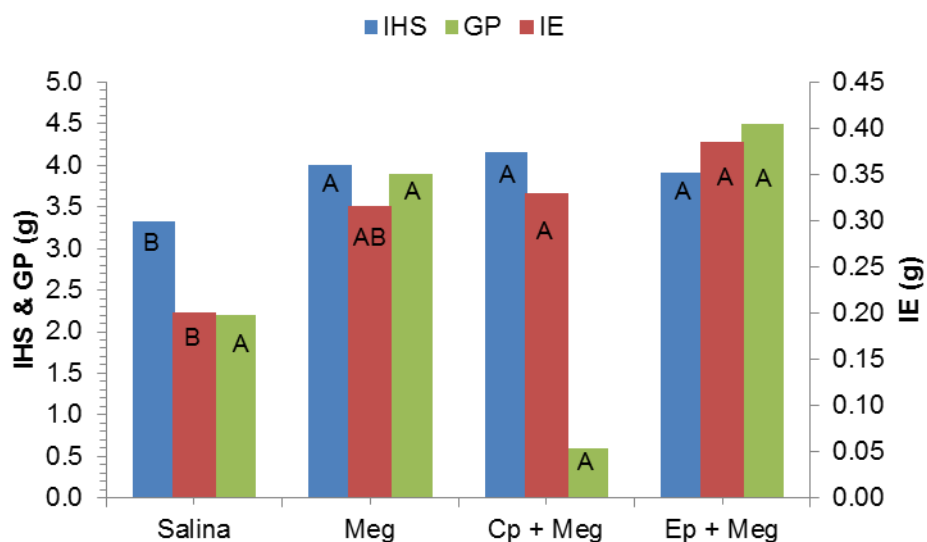


Figura 1A. Comparação do índice hepatossomático (IHS), do índice de ganho de peso (GP), e do índice esplênico (IE) entre os grupos de animais tratados e não tratados.

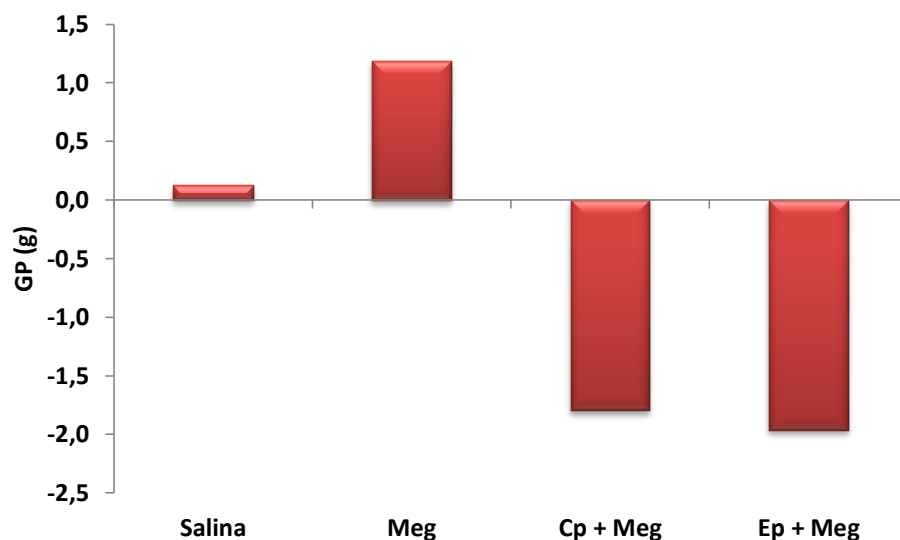


Figura 2A. Comparação do índice de ganho de peso entre os grupos de animais tratados e não tratados.

Tabela 2A. Comparação do peso dos camundongos e dos órgãos em relação ao tratamento para cada grupo

Peso (mg)	Tratamento	Mín.	Máx.	Amplitude	Media	IC	Desvio Padrão	CV%	
Fígado	Controle	513,0	833,0	320	684,5	b	607,2-761,8	108,0	15,8
	Meg	706,0	988,0	282	857,0	a	791,3-922,7	91,9	10,7
	Cp+Meg	688,0	939,0	251	846,1	a	784,5-907,8	80,2	9,5
	Ep+Meg	609,0	972,0	363	835,2	a	744,8-925,6	126,3	15,1
Baço	Controle	28,0	57,0	29,0	41,4	b	33,8-49	10,6	25,6
	Meg	43,0	100,0	57,0	67,8	a	55,3-80,3	17,5	25,8
	Cp+Meg	50,0	96,0	46,0	68,9	a	58,7-79,1	14,3	20,8
	Ep+Meg	50,0	116,0	66,0	72,1	a	53,3-90,8	24,4	33,8
Coração	Controle	63,0	89,0	26,0	77,1	b	69,4-84,8	9,2	11,9
	Meg	74,0	146,0	72,0	103,1	a	86,8-119,4	21,2	20,6
	Cp+Meg	70,0	123,0	53,0	95,0	ab	82,7-107,3	15,9	16,7
	Ep+Meg	76,0	127,0	51,0	97,2	ab	84,3-110,1	18,0	18,5
Camundongo	Controle	17,400	22,6	5,2	20,2	a	19-21,4	1,7	8,4
	Meg	18,200	24,6	6,4	21,5	a	20,3-22,7	1,7	7,9
	Cp+Meg	19,000	23,5	4,6	20,9	a	19,9-21,9	1,4	6,7
	Ep+Meg	18,000	25,0	7,1	21,5	a	19,8-23,2	2,3	10,7

*diferença significativa pelo teste de Anova ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Tabela 3A. Caracterização histológica dos tecidos e órgãos de camundongos C57BL/6 injetados, por via intramuscular, com solução fisiológica ou antimoníato de meglumina e tratados ou não com enalapril ou captopril durante 30 dias

Grupo	Músculo femoral	Coração	Estômago	Intestino	Fígado	Medula Óssea	Pulmão	Encéfalo	Rim
Salina	+(4)	-	-	-	-	-	-	-	-
Antimoníato de meglumina	+(4)	-	-	-	-	-	-	-	-
Antimoníato de meglumina + captopril	+(1)	-	+(2)	-	-	-	-	-	-
Antimoníato de meglumina + enalapril	+(1)(3)(4)	-	-	-	-	-	-	-	-
Captopril	-	*	*	*	*	*	*	*	*
Enalapril	-	*	*	*	*	*	*	*	*

+ alterações histológicas; - ausência de alterações histológicas; * órgãos não analisados

(1) infiltrado inflamatório misto, multifocal moderado e necrose multifocal de fibras musculares.

(2) há estruturas com morfologia similares a *Candida spp.* que pavimenta o epitélio estratificado queratinizado da parte esofágica.

(3) infiltrado inflamatório misto composto predominantemente por neutrófilo focalmente extenso moderado associado à necrose de fibras musculares.

(4) infiltrado inflamatório mononuclear multifocal moderado.

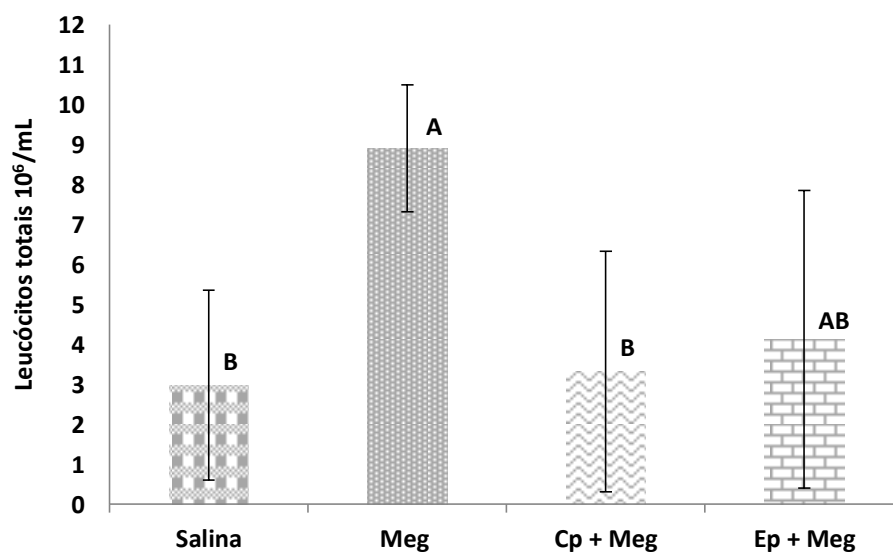


Figura 3A. Avaliação do efeito dos diferentes tratamentos na produção de leucócitos totais, de camundongos C57BL/6. Valores expressos pela média ± erro padrão da média; número de leucócitos circulantes. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

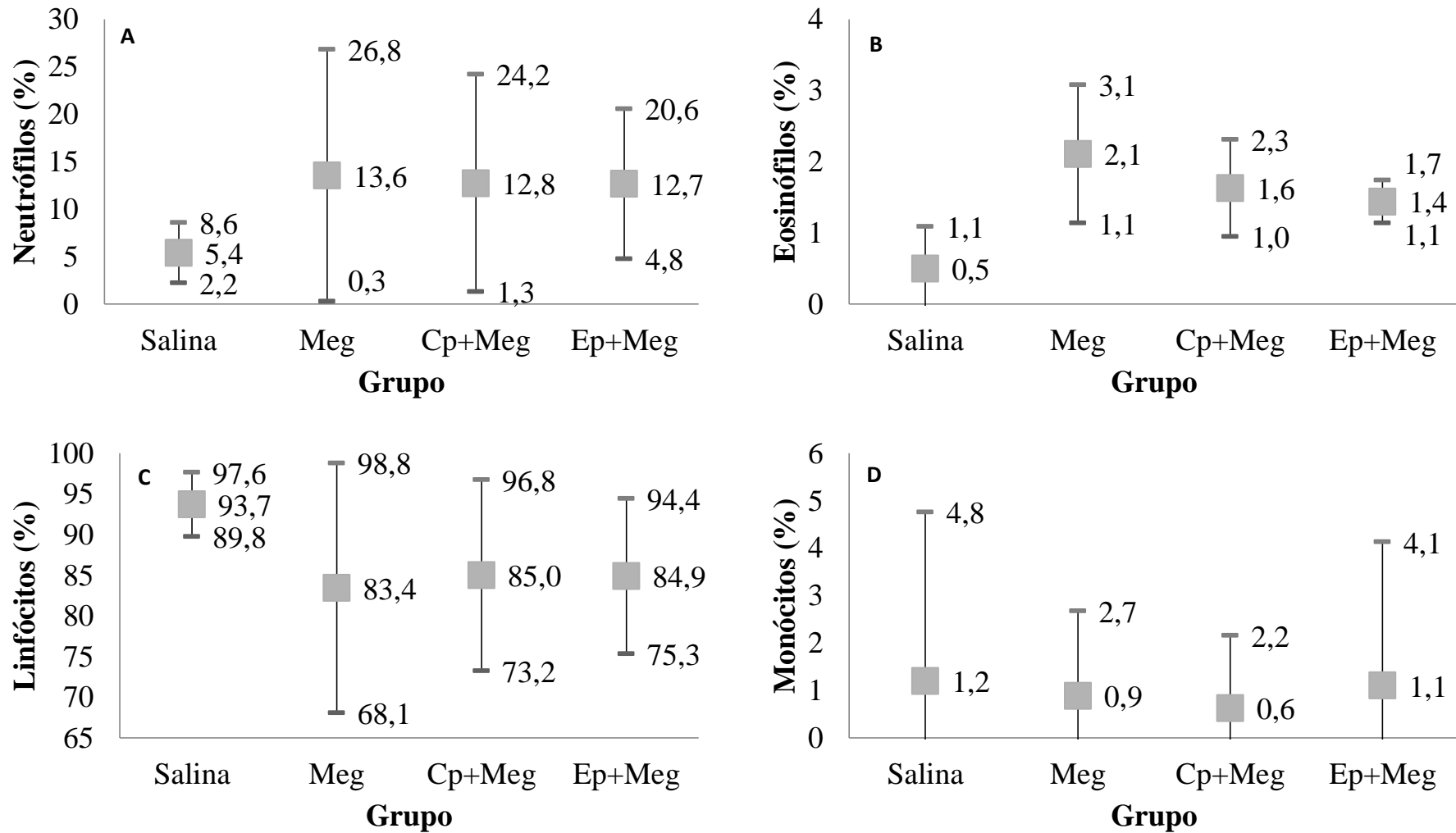


Figura 4A. Subpopulações de leucócitos no sangue periférico de camundongos C57BL/6 que foram injetados com: salina, antimoníato de meglumina (Meg), antimoníato de meglumina e tratados com captopril (Cp+Meg), antimoníato de meglumina e tratados com enalapril (Ep+Meg). Valores expressos pelo percentual \pm desvio padrão.

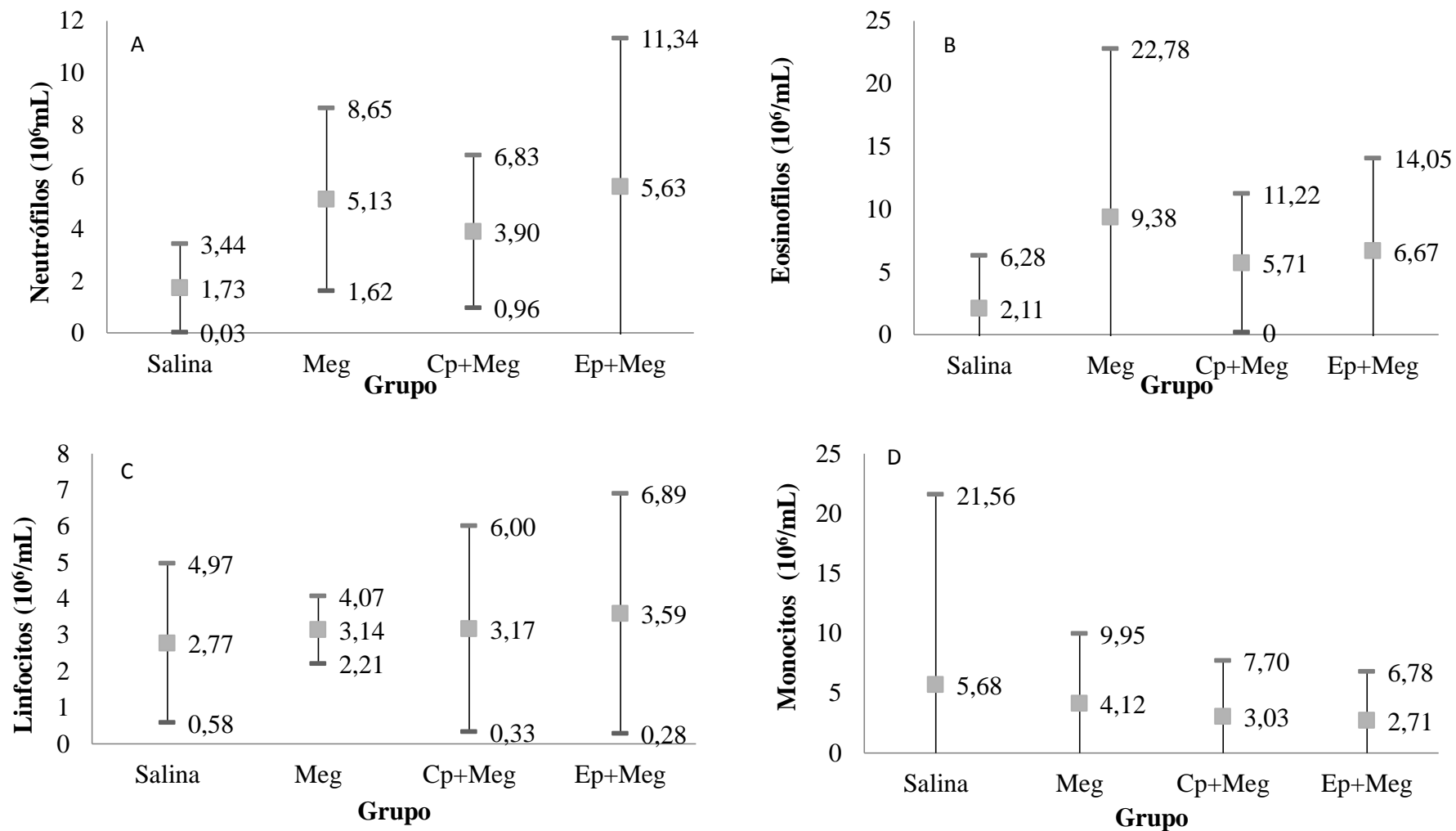


Figura 5A. Número absoluto de leucócitos no sangue periférico de camundongos C57BL/6 que foram injetados com: salina, antimoníato de meglumina (Meg), antimoníato de meglumina e tratados com captopril (Cp+Meg), antimoníato de meglumina e tratados com enalapril (Ep+Meg). Valores expressos

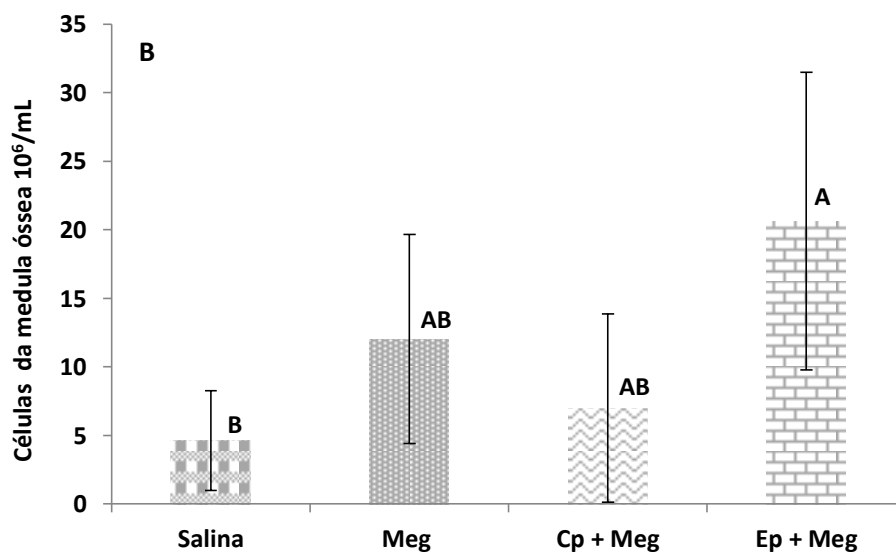


Figura 6A. Avaliação do efeito dos diferentes tratamentos na produção de células de medula óssea de camundongos C57BL/6. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).