



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Vicky Vanessa Ortega Gaona

Desenvolvimento de um sistema de liberação
sustentada de antimoniato de meglumina em
lipossomas e avaliação de sua atividade em
macrófagos DH82 infectados com *Leishmania*
infantum

CAMPINAS

2016

Vicky Vanessa Ortega Gaona

Desenvolvimento de um sistema de liberação
sustentada de antimoniato de meglumina em
lipossomas e avaliação de sua atividade em
macrófagos DH82 infectados com *Leishmania*
infantum

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestra em
Ciências, na área de concentração de *Fármacos,*
Medicamentos e Insumos para à Saúde

Este exemplar corresponde à versão
final da dissertação defendida pela
aluna Vicky Vanessa Ortega Gaona,
e orientada pela Profa.Dra.Eneida de
Paula

Orientadora: Eneida de Paula
Co-Orientadora: Selma Giorgio

CAMPINAS

2016

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Or8d Ortega Gaona, Vicky Vanessa, 1990-
Desenvolvimento de um sistema de liberação sustentada de antimoniató de meglumina em lipossomas e avaliação de sua atividade em macrófagos DH82 infectados com *Leishmania infantum* / Vicky Vanessa Ortega Gaona. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Eneida de Paula.
Coorientador: Selma Giorgio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Lipossomas. 2. Macrófagos. 3. Sistemas de liberação de medicamentos. 4. *Leishmania infantum*. 5. Antimoniató de meglumina. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Giorgio, Selma, 1962-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of sustained release system of meglumine antimoniate in liposomes and evaluation of its activity in DH82 macrophages infected with *Leishmania infantum*

Palavras-chave em inglês:

Liposomes

Macrophages

Drug delivery systems

Leishmania infantum

Meglumine antimoniate

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Eneida de Paula [Orientador]

Maria Isabel Nogueira Cano

Cintia Maria Saia Cereda

Data de defesa: 26-08-2016

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 26 de agosto de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Eneida de Paula

Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Profa. Dra. Cintia Maria Saia Cereda

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

À minha família, minha base meu maior suporte, meu pai Luís e minha irmã Sophia, sem seu apoio nada na minha vida seria uma realidade. Á minha mãe Marleny eu sei que você está orgulhosa, sempre lembrarei de seus ensinamentos meu anjo guardião, isto é para você.

Agradecimentos

Eu gostaria agradecer a todos os que colaboraram e influenciaram na realização deste sonho, a realização do meu mestrado. Dificuldades encontrei no caminho mas graças à ajuda e suporte de anjos no meu caminho, estou prestes à cumprir meu objetivo.

Sou infinitamente grata a minha orientadora e co-orientadora, Profa. Eneida de Paula e Profa. Selma Giorgio, por terem recebido nos seus respectivos laboratórios (Laboratório de Biomembranas e Laboratório de Leishmaniose) desde a realização do meu TCC e ainda por terem aceitado o desafio do desenvolvimento deste projeto, por sempre estarem presentes quando precisei, por ter me guiado e compartilhado o conhecimento nas áreas nas que são especialistas, das quais aprendi muito durante todo o processo.

Obrigada as meninas e meninos do laboratório de Biomembranas e do laboratório de Leishmaniose, aos que estão agora e aos que já se foram, vocês se tornaram mais do que meus colegas, são meus amigos, e os levarei sempre no meu coração. Muito obrigada pela ajuda de cada um, todos absolutamente todos colocaram seu grão de areia para que eu conseguisse realizar meu projeto, obrigada pelos papos científicos e informais, pelos risos, comemorações e cafezinhos, por terem sempre estado a disposição. Vê, com você aperfeiçoei meu português, além de sempre estar pronta para tirar minhas dúvidas sobre os lipossomas, Vivi e Luís, meus mestres na estatística, Simone e Ju minhas conselheras, Li, minha mestra na microscopia, Gustavo, o mais alto do lab (rsrsrs), sempre pegando o que nós, as baixinhas não conseguimos! Ao Marcio obrigada pelos papos e os socorros, com tudo que precisei na elaboração dos lipossomas, Bru como esquecer você? sempre levando música e alegria ao lab fiquei, com saudades!, Cintia e Alê, com seu jeito maternal e amoroso com todos, Dani, por bater papos em espanhol, comigo obrigada pelos ensinamentos com a Leishmania, à Iza, sua pupila obrigada pela disposição e companheirismo, Sol, pelas soluções simples e rápidas com as técnicas laboratoriais, às meninas Nah e Mari, pela ajuda com as culturas, ao Allan e Luiz pelos ensinamentos das técnicas chics e sofisticadas, que vocês manjam (rsrsrs). Obrigada a todos, ainda ficam muitas pessoas com as que sou grata, meu caminhar aqui não se realizaria sem sua ajuda e colaboração.

“Eu tentei 99 vezes e falhei na centésima tentativa eu consegui, nunca desista dos seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa”
Albert Einstein

Resumo

A Leishmaniose visceral (LV), é uma doença fatal e negligenciada, considerada pela OMS uma das seis doenças endêmicas de maior relevância no mundo. A doença é uma zoonose que tem o cão doméstico como principal reservatório urbano do parasito *L. infantum*; e a infecção de cães domésticos é denominada Leishmaniose Visceral Canina (LVC).

Os cães são considerados alvos estratégicos para o controle da doença. A infecção canina, geralmente, precede o aparecimento de casos humanos e é ainda, mais prevalente que a LV em humanos. No âmbito doméstico, a maioria dos cães com sorologia positiva não apresentam sinais clínicos, mas podem, como reservatórios, infectar os flebotomíneos. LVC é uma doença complexa e com altas taxas de prevalência, chegando a acometer 80 % de toda a população canina nas áreas endêmicas. A maioria dos estudos de candidatos a fármacos e sistemas de tratamentos para LVC foram realizados *in vivo*, sem condições experimentais controladas. Por isso, justifica-se o uso de linhagem de macrófagos de cão para estudos de toxicidade de fármacos *in vitro*. Além disso, considerando-se que não existe tratamento que garanta a cura parasitológica da LVC, é preciso desenvolver novas formulações farmacêuticas que ajudem melhorar a eficácia dos fármacos e tratamentos leishmanicidas, aumentando sua atividade e reduzindo a toxicidade.

Neste trabalho se objetivou desenvolver, caracterizar e avaliar, um sistema de infecção de macrófagos DH82 com *L. infantum* (*in vitro*), uma formulação lipossomal de liberação sustentada para o fármaco leishmanicida antimoniato de meglumina (AME), um dos principais fármacos utilizados no tratamento da LV, com uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da LVC.

Lipossomas unilamelares grandes (LUV) compostos por fosfatidilcolina de ovo, fosfatidilserina e colesterol (4:0,4:3-razão molar) foram preparados por extrusão, em pH 7.4. A formulação lipossomal foi caracterizada quanto à eficiência de encapsulação do AME (23 %).

As

formulações foram acompanhadas por 180 dias de armazenamento a 4 °C, quanto ao tamanho das vesículas polidispersão e potencial zeta. O diâmetro médio dos lipossomas encapsulados foi de $359 \pm 3,1$ nm e o potencial zeta mostrou-se bastante negativo (-61,5 mV) pela presença do lipídio (PS) carregado negativamente, na formulação. Os níveis de peroxidação não ultrapassaram 1 % do total de lipídios da formulação. Testes de citotoxicidade *in vitro*, em culturas de células DH82 revelaram que a AME livre induziu morte celular concentração dependente, com redução de 50 % da viabilidade celular após 96 horas com 0,005 M; efeito diminuído com o AME lipossomal (L-AME), o qual não atingiu 50 % da diminuição da viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas, indicando menor potencial tóxico contra macrófagos para a formulação proposta.

Testes de avaliação da atividade leishmanicida, revelaram capacidade do sistema

AME lipossomal em diminuir a carga parasitária dos macrófagos de cão em 30 vezes, comparado com o controle de macrófagos infectados mas não tratados, também mostrou uma diminuição de 49 % da carga parasitária em macrófagos infectados quando comparada com o AME livre na sua máxima concentração (0,01 M) após 96 horas de tratamento.

Finalmente encontrou-se colocalização e internalização dos lipossomas LUV (marcados com NDB-PE) e o parasito *L.infantum-mcherry* dentro dos macrófagos DH82 com um número superior às 3000 colocalizações nas 8 h e tratamento o que indica que quanto os lipossomas e o parasita tem o mesmo local de ação ajudando á entender os resultados obtidos nesta pesquisa quanto ao efeito leishmanicida do sistema lipossomal.

Abstract

Visceral Leishmaniasis (VL) is a fatal and neglected disease, considered, by the WHO, as one of the six endemic diseases with major relevance in the world. It is a zoonosis that have domestic dogs as main urban reservoir for the parasite *L. infantum*, and the infection in domestic dogs is named as Canine Visceral Leishmaniasis (CVL).

Dogs are considered strategic targets for the disease control measures. The canine infection usually precedes the onset of human cases being more prevalent than VL in humans. The most dogs with positive serology do not exhibit clinical signs, but may, as reservoirs, infect sand flies. CVL is a complex disease with high prevalence rates, up to 80 % of the canine population in endemic areas. Most studies of candidates to be drugs and treatments for CVL systems were performed *in vivo* without any control over the experimental conditions. In consequence, the use of dog macrophage lineages for *in vitro* drug toxicity studies are necessary. Furthermore, considering that, there is no treatment to guarantee the parasitological cure for CVL, it is necessary to develop pharmaceutical formulations to improve the effectiveness of leishmanicidal drugs and treatments, increasing this activity and reducing toxicity.

The aim of this work was to, develop, characterize and to assess a system to treat DH82 macrophage infection with *L. infantum* (*in vitro*), a sustained release liposomal formulation for the meglumine antimoniate (AME), the main drug used in VL treatment, thus, introducing a new therapeutic approach for the treatment of CVL.

Large unilamellar liposomes (LUVs) composed by egg-phosphatidylcholine, phosphatidylserine and cholesterol (4:0.04:3, molar ratio) were prepared by extrusion at pH 7.4. The liposomal formulation was characterized regarding the encapsulation efficiency of AME (23 %). The formulations was followed for 180 days of storage at 4 °C. The size, polydispersity index and zeta potential of the vesicles were measured. The mean diameter of encapsulated liposomes was found to be 359 ± 3.1 nm and the zeta potential was negative (-61.5 mV), by the presence of negatively charged lipid (PS), in the formulation. Peroxidation levels did not exceed 1 % of the total lipids in the formulation. Cytotoxicity studies using DH82 cells demonstrated that free AME induced cell death in a concentration dependent manner, showing a reduction of 50 % of cell viability in 96 hours at 0.005 M; the reduced cytotoxicity of liposomal-AME (L-AME), (which could not achieve the 50 % reduction of cell viability at any of the concentration tested), revealed lower toxic potential for the proposed formulation in macrophages.

The evaluation tests of leishmanicidal activity revealed the ability of L-AME system to decrease the amount/load of parasites in dogs macrophages by 30 times compared to the infected but not treated controlled macrophages and also showed a 49 % decrease of the parasites when compared with free AME treatment in its maximum concentration (0.01 M), after 96 hours of treatment.

Finally it was found colocalization and internalization of the liposome LUV (labeled with NBD-PE) and the parasite *L.infantum-m-cherry* within macrophages DH82 with a superior number of 3000 colocalizações at 8 h of treatment indicating that as the liposomes and the parasite has the same site of action, help us to understand the results obtained in this study as the leishmanicide effect of liposomal system

Índice de Ilustrações

Figura 1 – Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> nas Américas (PAHO, 2015).	19
Figura 2 – Vetor da <i>Leishmania</i> nas Américas, o flebotomíneo <i>Lutzomyia</i>	20
Figura 3 – Espécies reservatórias da <i>Leishmania</i> . Fileira superior, da esquerda à direita: raposa, marsupial e roedor. Fileira inferior, da esquerda à direita: tamanduá, preguiça e cão.	20
Figura 4 – Formas celulares da <i>Leishmania</i> . Esquerda: forma promastigota. Direita: forma amastigota. (Adaptada de Xavier Studio, 2015).	20
Figura 5 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> . Adaptado de CDC-Centers for Disease Control and Prevention, 2015).	21
Figura 6 – Paciente com leishmaniose visceral, área palpável do fígado e baço marcados por caneta, mostrando grande aumento desses dois órgãos. (Adaptado de CDC-Centers for Disease Control and Prevention, 2015).	21
Figura 7 – Lesões apresentadas nos cães pelo aparecimento da leishmaniose visceral canina. Atrofia muscular, anemia e emagrecimento (A), dermatite, descamação, queda de pelo e ulcerações (B-D), crescimento desmedido das unhas (C).	23
Figura 8 – Esquerda: <i>Glucantime</i> [®] forma comercial do antimoníato de meglumina. Direita: estrutura molecular do antimoníato de meglumina	25
Figura 9 – Representação esquemática dos tipos de lipossomas (vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), GUV e vesículas multilamelares grandes (MLV)), seus respectivos tamanhos e vista ampliada das bicamadas de fosfolípidios. (Adaptado de Fonseca-Santos, 2015)	29
Figura 10 – Representação esquemática da organização de um lipossoma remetendo as possíveis formas de inserção de compostos hidrofílicos, lipofílicos e anfifílicos. Esquerda: lipossoma unilamelar. direita: lipossoma multilamelar. (Adaptado de: De Araujo, 2008)	30
Figura 11 – Diagrama da caracterização físicoquímica realizada ao sistema lipossomal L-AME.	40
Figura 12 – Diagrama dos ensaios <i>in vitro</i> realizados aos macrófagos <i>DH82</i> e os parasitos <i>Leishmania infantum</i> , para a avaliação biológica do sistema lipossomal L-AME.	40
Figura 13 – Curva padrão de calibração de fosfato inorgânico ($r=0,99991$), realizada por medição espectrofotométrica da absorbância (UV <i>vis</i>) à 795 nm.	51
Figura 14 – Medidas do diâmetro médio (nm) obtidas por distribuição de intensidade (barras superiores), índice de polidispersão (PDI-tracejado), e potencial zeta (ζ -) (barras inferiores), das vesículas lipossomais (5 mM) não estéreis, encapsulando ou não antimoníato de meglumina (AME) (0; 0,001; 0,005 e 0,01 M), em função do tempo de armazenamento (180 dias-4 °C), obtidas por DLS. (n=3).	53

Figura 15 – Medidas do tamanho (barras superiores), índice de polidispersão (PDI-tracejado), e potencial zeta (ζ -) (barras inferiores) das vesículas lipossomais (5 mM) estéreis LUV encapsulando ou não AME (0 e 0,01 M), durante 180 dias, obtidas por DLS. (n=3).	54
Figura 16 – Microfotografias das vesículas lipossomais contendo AME. (A-B) Formulação não estéril. (C-D) Formulação estéril. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, por coloração negativa das vesículas com uranila.	58
Figura 17 – Curva padrão de calibração do TEP; utilizada para a determinação da taxa de peroxidação lipídica das formulações lipossomais avaliadas com 5 mM de lipídios totais.	59
Figura 18 – Curva de proliferação celular de macrófagos DH82, aproximadamente 1×10^5 células foram cultivadas em meio de cultura DME, incubados com 5 % CO_2 , 21 % O_2 e N_2 balanceado, á 37 °C durante 25 dias. As células foram retiradas com intervalo de 3 dias dos frascos de cultivo e contadas em câmara de Neubauer.	61
Figura 19 – Imagens de microscopia confocal: (A, D, G) macrófagos DH82 marcados com anticorpo primário <i>Mouse anti-dog CD11c</i> em canal verde; (B, E, H) macrófagos DH82 com marcador de núcleo TO-PRO-3 em canal azul; (C, F, I) macrófagos DH82 em sobreposição de canais verde (<i>Mouse anti-dog CD11c</i>) e azul (TO-PRO-3).	62
Figura 20 – Análise de citometria de fluxo das células DH82 e J774, marcadas com anticorpo primário <i>Mouse anti-dog CD11c</i> , anticorpo secundário <i>Alexa 488 anti-mouse</i> . O gráfico da esquerda mostra a percentagem de células fluorescentes e o da direita, a intensidade da fluorescência registrada.	63
Figura 21 – Curva de proliferação celular de promastigotas de <i>L. infantum</i> , cerca de $\log(10) 2,0 \times 10^6$ promastigotas/mL foram cultivados em meio Schneider, e mantidos em estufa a 26 °C. Os parasitas foram retirados diariamente dos frascos de cultivo e contados em camara de Neubauer	64
Figura 22 – Percentagem de infecção de macrófagos DH82 com promastigotas (A) e amastigotas (B) de <i>L. infantum</i> , nas proporções 5:1, 10:1, 20:1 parasita: célula. Número de amastigotas por célula, células infectadas com promastigotas (C) e amastigotas (D).	65
Figura 23 – Micrografia da célula DH82 com a forma intracelular amastigota do parasita <i>L. infantum</i> , na proporção 20:1. Colorada com Giemsa. aumento de 100X.	65
Figura 24 – Logaritmo do número de promastigotas de <i>L. infantum</i> por mL após tratamento com diferentes concentrações de AME , durante 48 e 96 h. Células cultivadas em meio Schneider a 26 °C, contadas em câmara de Neubauer.	66

Figura 25 – Viabilidade celular de macrófagos DH82 não infectados e tratados com diferentes concentrações de AME e L-AME, durante 48 e 96 h. Células cultivadas em meio DME a 37°C. Imagens correspondentes à: técnica de exclusão por azul de tripan; tratado com AME (A), tratado com L-AME (B); técnica de redução do MTT: com AME (C), com L-AME (D).	68
Figura 26 – Percentagem de infecção de macrófagos DH82 infectados com <i>L.infantum</i> e tratados com: AME livre (A), AME lipossomal (L-AME) (B), após 48 e 96 h.	69
Figura 27 – Micrografias de macrófagos DH82, corados com Giemsa (100x). Faixa superior, macrófagos não infectados após 96 h de tratamento: (A) sem tratamento, (B) tratados com AME, (C) tratados com L-AME. Faixa inferior, macrófagos infectados com promastigotas de <i>L.infantum</i> , após 96 h de infecção: (D) sem tratamento, (E) após tratamento com AME 0,01M, (F) após tratamento com L-AME 0,01M. As setas indicam a presença de amastigotas.	70
Figura 28 – Percentagem da viabilidade celular de macrófagos DH82 infectados com <i>L.infantum</i> após 48 e 96 h.(A) macrófagos tratados com AME; (B) macrófagos tratados com L-AME	71
Figura 29 – Número de colocalizações intracelulares em macrófagos DH82 do parasito <i>L. infantum</i> e dos lipossomas LUV com NDB-PE após 2,4,6 e 8h de tratamento. Análise realizado por tratamento de imagens obtidas por microscopia confocal com o programa ImageJ.	73
Figura 30 – Número de colocalizações intracelulares em macrófagos DH82 com marcador de núcleo DRAQ5 (canal azul) do parasito <i>L. infantum-mcherry</i> (canal vermelho) e dos lipossomas LUV com NDB-PE (canal verde) após 2,4,6 e 8h de tratamento. Análise realizado por tratamento de imagens obtidas por microscopia confocal com o programa ImageJ.	74
Figura 31 – Número de colocalizações intracelulares em macrófagos DH82 do parasito <i>L. infantum</i> e dos lipossomas LUV com NDB-PE após 8h de tratamento. (A) Marcação do núcleo dos macrófagos DH82 com DRAQ5 observado no canal azul. (B)Macrófagos DH82 infectados com parasitos <i>L.infantum-mcherry</i> observados no canal vermelho. (C) Macrófagos DH82 com lipossomas LUV marcados com NDB-PE observados no canal verde. (D) Colocalização dos lipossomas marcados com NDB-PE e os parasitos <i>L.infantum-mcherry</i> dentro dos macrófagos DH82 observada pela emissão no canal amarelo. Análise realizado por tratamento de imagens obtidas por microscopia confocal com o programa ImageJ.	75

Figura 32 – Microfotografias das amostras liofilizadas: (A,B,C,D) complexo AME:HP- β CD revelando o ponto de congelamento, borda liofilização, micro e macro colapso, respectivamente; (E,F,G,H) antimoniato de meglumina livre revelando o ponto de congelamento, borda liofilizada, micro e macro colapso, respectivamente; (I,J,K,L) ponto de congelamento, borda liofilizada, micro e macro colapso. Apesar de o processo de liofilização ter se mostrado apropriado ao preparo do complexo AME:HP- β CD, algumas características físicas macroscópicas do complexo mostraram-se instáveis após re-solubilização, nos levando a questionar a estabilidade do mesmo. Desta forma, usamos medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para investigar a presença de possíveis agregados macromoleculares, no complexo AME:HP- β CD.	95
Figura 33 – Difrátogramas de Raios-X da HP- β CD livre (linha preta), complexo AME:HP- β CD (linha vermelha), AME livre (azul), mistura física da HP- β CD e do AME (verde).	97
Figura 34 – Espectros de ^1H -RMN para AME (A) e meglumine (B, retirado da literatura) em 400,13 MHz, temperatura 25°C.	98
Figura 35 – Espectros de ^1H -RMN da HP- β CD (A) e do complexo AME:HP- β CD (B), medidos em 400,13 MHz, temperatura 25 °C.	99
Figura 36 – Espectros DOSY de ^1H -RMN da HP- β CD (A) e do complexo AME:HP- β CD (B), medidos em 400,13 MHz, temperatura 25 °C	100

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Componentes do reagente de trabalho	42
Tabela 2 – Medidas do diâmetro médio das formulações lipossomais LUV não estéreis sem e com diferentes concentrações de AME (0; 0,001; 0,005 e 0,01 M) em função do tempo de armazenamento (180 dias-4 °C). Análise estatístico realizado com o teste ANOVA duas vias/tukey (teste de comparações múltiplas). (n=3). Valores de significância estatística: $p<0,0001$ (****), $p<0,001$ (***), $p<0,05$ (*). Análises estatísticas realizadas: 1- comparação da variação dos valores do diâmetro médio das diferentes formulações encapsuladas respeito ao controle em cada um dos tempos de armazenamento (representada pelas letras) 2- comparação da variação dos valores do diâmetro médio de cada uma das formulações (controle e encapsulada) ao longo do tempo respeito ao tempo inicial (0)(representada pelas letras mais números).	55
Tabela 3 – Medidas do diâmetro médio das formulações lipossomais LUV estéreis sem e com AME (0; 0,01 M) em função do tempo de armazenamento (180 dias-4 °C). Análise estatística realizada com o teste ANOVA duas vias/tukey (teste de comparações múltiplas). n=3. Valores de significância estatística: $p<0,0001$ (****), $p<0,001$ (***), $p<0,01$ (**) $p<0,05$ (*). Análises estatísticas realizadas: 1- comparação da variação dos valores do diâmetro médio da formulação encapsulada respeito ao controle em cada um dos tempos de armazenamento (representada pelas letras); 2- comparação da variação dos valores do diâmetro médio das formulações (controle e encapsulada) ao longo do tempo respeito ao tempo inicial (0), (representada pelas letras mais números).	57
Tabela 4 – Percentagem de lipídios oxidados nas formulações lipossomais, em relação à concentração de lipídios totais determinado pelo teste de TBA.	59
Tabela 5 – Eficiência de encapsulação (%EE) das formulações lipossomais. (n=3) . . .	60
Tabela 6 – Diâmetro médio e polidispersao (PDI) em amostras de AME: HP- β CD (proporção molar 1:1) antes do processo de liofilização, medidos durante 4 dias.	96
Tabela 7 – Diâmetro médio e PDI de amostra do complexo AME:HP- β CD na proporção molar 1:1; liofilizado após 1 dia de equilíbrio e ressuspenso em água desionizada ou tampão HEPES 20 mM pH 7,4 + NaCl 150 Mm	96
Tabela 8 – Deslocamentos químicos ($\delta\Delta$ em ppm) e atribuição de hidrogênios para as amostra de HP- β CD (de acordo com a figura 36).	99
Tabela 9 – Coeficientes de Difusão (D) do AME, HP- β CD, e do complexo AME:HP- β CD, fração molar do complexo e constante de associação (Kas) AME:HP- β CD. .	100

Índice de Abreviaturas e Siglas

- AmB** anfotericina B. 24, 26, 28, 31, 32
- AME** antimoníato de meglumina. 16, 17, 24, 31, 32, 34–36, 41, 43, 48, 49, 51–54, 66
- ASB** albumina sérica bovina. 46
- BHT** hidroxitoluenobutilado. 44
- CHOL** colesterol. 35, 36, 41, 50, 51, 76
- DH82** macrófagos de cão de linhagem tumoral. 17, 34, 35, 39, 40, 45, 46, 48
- DMEM** meio de cultura celular de Eagle modificado por Dulbecco. 45, 46
- EAA** espectrometria de absorção atômica. 45
- EPC** fosfatidilcolina de ovo. 35, 36, 41, 44, 50–52, 76
- IC50** concentração inibitória média. 33
- L-AmB** anfotericina B lipossomal. 32
- L-AME** antimoníato de meglumina lipossomal. 33, 35, 40, 43, 45, 48, 49, 69
- LUV** vesículas unilamelares grandes. 29, 35, 41, 52, 54
- LV** leishmaniose visceral. 16, 20, 22, 23, 31, 32
- LVC** leishmaniose visceral canina. 16, 22, 27, 28, 34
- MET** microscopia eletrônica de transmissão. 43
- MLV** vesículas multilamelares grandes. 29, 41, 44
- MTT** brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]. 49
- PBS** tampão fosfato salino. 46, 48, 50
- PS** fosfatidilserina. 17, 33–36, 41, 50–52, 76
- Schneider** meio de cultura para o crescimento de linhagens celulares de insetos. 47, 48
- SDS** dodecilsulfato de sódio. 44

SFB soro fetal bovino. 45, 47

SFM sistema fagocítico mononuclear. 20

SUV vesículas unilamelares pequenas. 29, 32

TBA ácido tiobarbitúrico. 44

TEP tetraetoxipropano. 44

Sumário

Índice de Ilustrações	
Índice de Abreviaturas e Siglas	
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Leishmaniose	18
2.2 Leishmaniose Visceral	20
2.3 Leishmaniose Visceral Canina	21
2.4 Prevenção e Controle da Leishmaniose	22
2.5 Diagnóstico da Leishmaniose	24
2.6 Tratamento da Leishmaniose	24
2.6.1 Antimoniais Pentavalentes	24
2.6.2 Anfotericina B	26
2.6.3 Pentamidina	26
2.6.4 Paromomicina	26
2.6.5 Miltefosina	27
2.6.6 Alopurinol	27
2.7 Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina	27
2.8 Lipossomas	28
2.8.1 Lipossomas no Tratamento da Leishmaniose	31
3 JUSTIFICATIVA	34
4 OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo Geral	35
4.2 Objetivos Específicos	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 Materiais	36
5.1.1 Reagentes	36
5.1.2 Equipamentos	38
5.1.3 Softwares	39
5.1.4 Células	39
5.2 Métodos	40
5.2.1 Ensaios Químicos	41
5.2.1.1 Lipossomas para o carregamento do antimoniato de meglumina (L-AME).	41
5.2.1.2 Medida da Concentração Total de Fosfolípidios	41
5.2.1.3 Medida da Distribuição de Tamanho, Polidispersão e Potencial Zeta (ζ -) dos Lipossomas	42

5.2.1.4	Morfologia das Formulações: Microscopia Eletrônica de Transmissão	43
5.2.1.5	Estimativa da Peroxidação de Fosfolipídios	43
5.2.1.6	Determinação da Eficiência da Encapsulação	45
5.2.2	Ensaio Biológicos	45
5.2.2.1	Macrófagos da linhagem DH82	45
5.2.2.1.1	Contagem dos Macrófagos DH82	45
5.2.2.1.2	Curva de Proliferação dos Macrófagos DH82	46
5.2.2.2	Imunofluorescência dos Macrófagos DH82	46
5.2.2.3	Análise por Citometria de Fluxo da linhagem de Macrófagos DH82	46
5.2.2.4	Cultura dos parasitos de <i>L.infantum</i>	47
5.2.2.4.1	Contagem dos parasitos de <i>L.infantum</i>	47
5.2.2.4.2	Curva de proliferação de Promastigotas de <i>L.infantum</i>	47
5.2.2.5	Ensaio de Infecção dos Macrófagos DH82 com <i>L.infantum</i> . .	48
5.2.2.6	Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade Celular	48
5.2.2.6.1	Toxicidade do AME em Promastigotas de <i>L. Infantum</i>	48
5.2.2.6.2	Citotoxicidade do AME e do AME lipossomal (L-AME) em macrófagos DH82	48
5.2.2.6.3	Atividade Antileishmania do AME livre e AME lipossomal (L-AME) em macrófagos DH82 infectados com <i>L.infantum</i> .	49
5.2.3	Estudos de colocalização intracelular lipossoma-parasita.	50
5.2.4	Análise Estatística	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1	Ensaio Químicos	51
6.1.1	Lipossomas para carregamento de AME	51
6.1.2	Medida da Concentração Total de Fosfolipídios	51
6.1.3	Medida da Distribuição de Tamanho e Potencial Zeta (ζ -) dos Lipossomas	52
6.1.4	Morfologia das formulações: Microscopia Eletrônica de Transmissão .	58
6.1.5	Estimativa da Oxidação de Fosfolipídios	58
6.1.6	Determinação da Eficiência da encapsulação	60
6.2	Ensaio Biológicos	60
6.2.1	Curva de Proliferação dos Macrófagos DH82	60
6.2.2	Imunofluorescência dos macrófagos caninos DH82	61
6.2.2.1	Análise por Citometria de fluxo dos Macrófagos DH82	62
6.2.3	Curva de Proliferação celular dos Promastigotas de <i>L.infantum</i>	63
6.2.4	Padronização do ensaio de Infecção dos Macrófagos DH82 com <i>L.infantum</i>	64
6.2.5	Ensaio de Toxicidade e Viabilidade Celular	66
6.2.5.1	Toxicidade do AME em promastigotas de <i>L. Infantum</i>	66

6.2.5.2	Citotoxicidade do AME e do AME lipossomal (L-AME) em Macrófagos DH82	67
6.2.5.3	Atividade Antileishmania do AME e do L-AME em macrófagos DH82 infectados com <i>L.infantum</i>	69
6.2.6	Estudos de colocalização intracelular lipossoma-parasita.	72
7	CONCLUSÕES	76
	Referências	77
A	Anexo	94
A.1	Preparo e caracterização do complexo AME em Hidroxipropil β ciclodextrina .	94
A.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia óptica acoplada a liofilização (FDM)	94
A.3	Medidas de espalhamento de luz dinâmico para avaliar possível agregação do complexo HP- β CD:AME por DLS	94
A.4	Difração de Raios X	96
A.5	Medidas de Ressonância Magnética Nuclear	97
A.6	Publicações relacionadas ao tratamento da Leishmaniose através do uso de antimoniato de meglumina (AME) encapsulado em lipossomas	101

1 INTRODUÇÃO

O termo leishmaniose compreende um grupo de doenças cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que acomete principalmente populações de baixa renda, e figura como importante problema de Saúde Pública. Encontra-se presente em todos os continentes, predominando em áreas tropicais e subtropicais do planeta, sendo endêmica em 98 países com mais de 350 milhões de pessoas em risco (ALVAR *et al.*, 2012; BOER *et al.*, 2011; PAHO, 2015).

Nas Américas, a leishmaniose representa um importante problema de saúde pública devido à sua alta morbidade e ampla distribuição geográfica. Seu ciclo de transmissão complexo inclui diferentes espécies de parasitas, vetores e reservatórios. Populações pobres com dificuldade de acesso aos serviços de saúde são as mais afetadas (PAHO, 2015).

As leishmanioses são doenças com largo espectro de sintomas, lesões cutâneas simples, que se curam espontaneamente, lesões mucosas com destruição tecidual intensa e lesões mais profundas na leishmaniose visceral (LV), quando o parasita tem tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides. A LV é uma doença sistêmica, crônica e que pode ser fatal, se não tratada (MOUGNEAU *et al.*, 2011).

O cão preenche as condições necessárias para ser considerado o mais importante reservatório urbano, da forma zoonótica da leishmaniose visceral, denominada leishmaniose visceral canina (LVC), sendo responsável pela manutenção do parasita nos focos endêmicos, quer pela alta prevalência da doença entre estes animais, quer pela sua proximidade ao homem (MORENO; ALVAR, 2002; ALVAR *et al.*, 2012; BANETH; AROCH, 2008).

Não há um tratamento eficaz contra a leishmaniose. As medidas de controle atuais são baseadas unicamente na quimioterapia. Antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (AME), são o tratamento de primeira escolha, mas os efeitos colaterais tais como cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade e o surgimento de resistência por parte do parasita a eles tem limitado a sua utilidade. Por isso os atuais desafios de quimioterapia leishmanicida incluem a baixa disponibilidade de medicamentos, surgimento e desenvolvimento de resistência a fármacos existentes e sua alta toxicidade. Portanto, é extremamente importante encontrar medicamentos e tratamentos eficazes para o tratamento da leishmaniose (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

Os objetivos dos sistemas de entrega de fármacos são prolongar, melhorar e controlar a administração do fármaco. Muitos estudos estão sendo feitos nesta área, a fim de desenvolver novas formulações com vantagens sobre as formulações convencionais. Estratégias para a entrega de fármacos nos sistemas de liberação incluem importantes aplicações da nanotecnologia (RAWAT *et al.*, 2006; ANTON *et al.*, 2008; MISHRA *et al.*, 2010).

Os lipossomas têm sido o sistema de entrega de fármacos mais utilizado nos últimos 30 anos, eles consistem de agregados coloidais de fosfolípidios e colesterol amplamente usados para encapsulação de medicamentos, podem levar ao aumento da especificidade da interação dos compostos ativos com os seus locais de ação, proteção de ativos sujeitos à degradação, redução da toxicidade e efetiva liberação dos fármacos carregados (ALLEN; CULLIS, 2013).

Os lipossomas são biodegradáveis, não-tóxicos e capazes de interagir com as células, devido à semelhança entre a sua composição e as membranas celulares, o que lhes confere uma grande capacidade de absorção no local de ação; sendo veículos de entrega de fármacos (*drug-delivery systems*, DDS). Este tipo de sistema proporciona uma maior eficácia e segurança ao tratamento, uma vez os fármacos são adsorvidos ou encapsulados em transportadores, reduzindo a dose e reações adversas das formulações convencionais.

Considerando as dificuldades encontradas no tratamento da leishmaniose, a pesquisa desenvolvida e apresentada nesta dissertação foi focada no melhoramento do tratamento desta doença de importância médica e sanitária, através do desenvolvimento de uma formulação de AME encapsulado em lipossomas contendo fosfatidilserina (PS) na sua composição, e sua avaliação em macrófagos de cão de linhagem tumoral (DH82) num sistema de infecção *in vitro* com o parasita *Leishmania infantum*.

Cabe mencionar que a proposta inicial da pesquisa era o desenvolvimento de um sistema de duplo carregamento, que envolvia um complexo AME-ciclodextrina encapsulado nos lipossomas. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos usados como carreadores em DDS, conhecidas por sua capacidade de aumentar a solubilidade de fármacos (KURKOV, 2013). Porém não foi possível atingir o objetivo planejado por dificuldades encontradas na complexação do AME com ciclodextrina e por esta razão a proposta da pesquisa teve que ser redirecionada, focando no sistema AME-lipossomal. Os dados referentes aos ensaios de complexação do AME com a ciclodextrina podem ser encontrados na secção de ANEXOS no final desta dissertação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo contém na primeira seção uma revisão da literatura, relacionada à leishmaniose e sua classificação (em leishmaniose visceral e leishmaniose visceral canina), métodos de prevenção, controle, diagnóstico e tratamento. Na segunda seção encontra-se um levantamento bibliográfico de estudos relacionados com lipossomas e suas aplicações ao tratamento da leishmaniose.

2.1 Leishmaniose

Nas Américas, as leishmanioses são doenças zoonóticas (transmitidas dos animais às pessoas) causadas por diferentes espécies protozoárias *Leishmania*, transmitidas aos seres humanos e animais por insetos flebótomos da família Psychodidae (PAHO, 2015).

O parasita é um protozoário pertencente à família Tripanosomatidae. O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* e compreende 22 espécies patogênicas para o homem, dos quais 15 foram identificados nas Américas, como mostrado na figura 1 (PAHO, 2015).

Vetores do parasita *Leishmania* são hematófagos Diptera (família Psychodidae, subfamília Phlebotominae), comumente conhecidos como flebotomíneos. Os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, vetores da leishmaniose, *Lutzomyia* é o transmissor da *L. infantum* nas Américas (Figura 2). No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora do parasito para o homem e animais reservatórios (LAINSON; RANGEL, 2005).

Nas Américas, o ciclo de transmissão da leishmaniose é zoonótica, requerendo a presença de um reservatório animal para a manutenção do parasita no meio ambiente. Reservatórios silvestres identificados para diferentes espécies de *Leishmania* incluem marsupiais (*Didelphis spp.*), preguiça (*Choloepus spp.*, *Bradypus spp.*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), raposa (*Cerdocyon thous*) e roedores (*Rattus spp.*, *Proechimys spp.*, *Nectomys spp.*, *Oryzomys spp.*, etc.) (Figura 3). No meio urbano, o cão é o principal reservatório de *L. infantum* (Figura 3), e sua infecção com *leishmania* é denominada leishmaniose visceral canina que pode ser grave, subclínica ou uma patologia auto-limitante (PAHO, 2015; MORENO; ALVAR, 2002).



Figura 1 – Distribuição das espécies de *Leishmania* nas Américas (PAHO, 2015).

A *Leishmania* infecta mamíferos através do repasto sanguíneo (ato do inseto se alimentar de sangue diretamente do animal) de um flebotomíneo (HANDMAN, 2001). Ao picar um mamífero, o vetor transmite a forma promastigota do parasita, que se adere a fagócitos mononucleares teciduais (macrófagos e células dendríticas) por fagocitose e inserção do lisossomo. Nessas células há formação do vacúolo parasitóforo, resultado da fusão do vacúolo citoplasmático com endossomos e lisossomos. Neste ambiente intracelular, o parasita passa da forma promastigota para a forma amastigota (Figura 4), por meio da divisão binária, os amastigotas se multiplicam até o rompimento da célula hospedeira, liberando amastigotas que serão fagocitados por outros macrófagos. A continuação do ciclo se dá quando um inseto, se infecta ao picar um mamífero já infectado, passando assim a transmitir o protozoário (SOUZA, 2005; HANDMAN, 2001). O ciclo de vida da *Leishmania* é mostrado na figura 5.



Figura 2 – Vetor da *Leishmania* nas Américas, o flebotomíneo *Lutzomyia*.



Figura 3 – Espécies reservatórias da *Leishmania*. Fileira superior, da esquerda à direita: raposa, marsupial e roedor. Fileira inferior, da esquerda à direita: tamanduá, preguiça e cão.

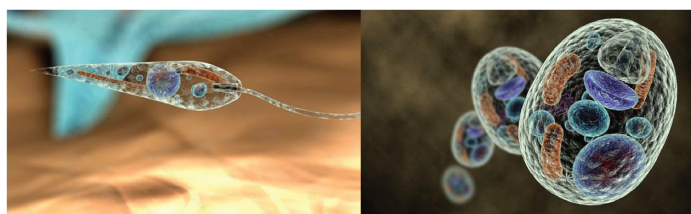


Figura 4 – Formas celulares da *Leishmania*. Esquerda: forma promastigota. Direita: forma amastigota. (Adaptada de Xavier Studio, 2015).

2.2 Leishmaniose Visceral

A LV é causada pela espécie *L. infantum*, se apresenta quando o parasita tem tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides. A LV tem como característica, em humanos, causar lesões viscerais, acompanhadas de esplenomegalia, hepatomegalia e afecção na medula óssea, observando-se acessos irregulares de febre, perda de peso, aumento de volume do baço, do fígado e anemia (Figura 6), chegando a ser fatal, principalmente em crianças e imunodeprimidos, se não tratada (MOUGNEAU *et al.*, 2011; MURRAY *et al.*, 2005).

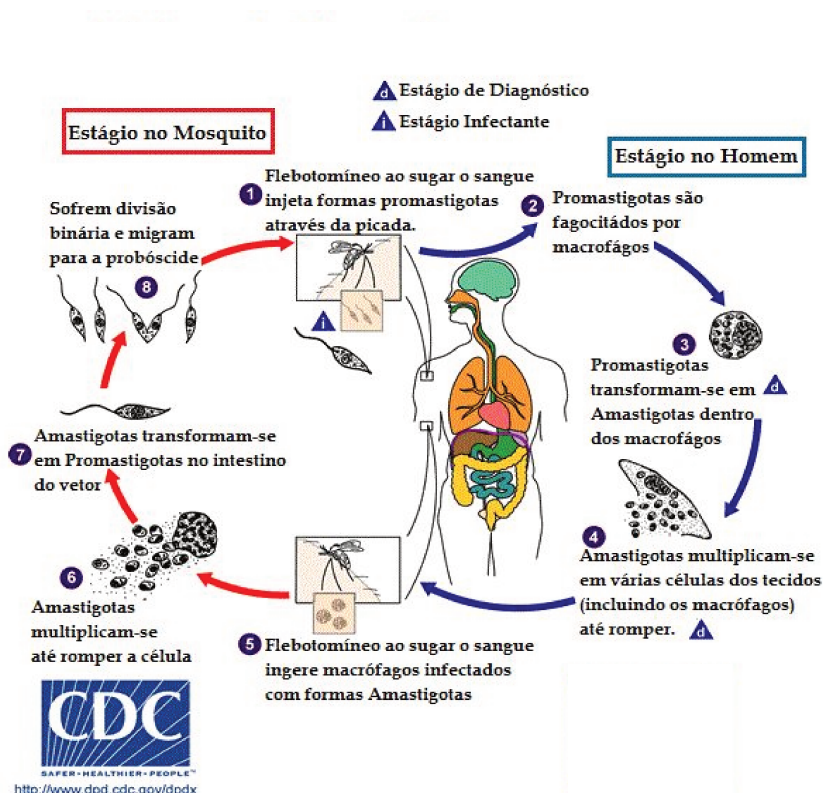


Figura 5 – Ciclo de vida da *Leishmania*. Adaptado de CDC-Centers for Disease Control and Prevention, 2015).



Figura 6 – Paciente com leishmaniose visceral, área palpável do fígado e baço marcados por caneta, mostrando grande aumento desses dois órgãos. (Adaptado de CDC-Centers for Disease Control and Prevention, 2015).

2.3 Leishmaniose Visceral Canina

O cão preenche as condições necessárias para ser considerado o mais importante reservatório urbano, quer pela alta prevalência da doença entre estes animais, quer pela presença de formas amastigotas na pele ou pela sua proximidade ao homem. Por esta razão, esses animais são considerados alvos estratégicos para medidas de controle da doença (BANETH; AROCH,

2008; ALVAR *et al.*, 2004; MORENO; ALVAR, 2002).

A infecção canina, geralmente, precede o aparecimento de casos humanos e é ainda, mais prevalente que a LV em humanos. No âmbito doméstico, a maioria dos cães com sorologia positiva não apresenta sinais clínicos, mas pode, como reservatório, infectar os flebotomíneos (MORENO; ALVAR, 2002).

A leishmaniose visceral canina LVC é uma doença complexa e com altas taxas de prevalência, chegando a acometer 80 % de toda a população canina nas áreas endêmicas. Nos cães, as manifestações clínicas da doença não seguem um padrão, apresentando diferentes sinais clínicos que refletem o grau de gravidade da doença (BANETH; AROCH, 2008; ALVAR *et al.*, 2004).

A LV é endêmica em mais de 70 países, sendo encontrada no Sul e Sudoeste da Europa, na África, Ásia e nas Américas (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

O número de cães infectados por *L. infantum* nas Américas é estimado em milhões. Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 13 países e a maior prevalência (90%) dos casos ocorre na Venezuela e no Brasil (PAHO, 2015).

A LVC é caracterizada por marcante pleomorfismo, com os sinais clínicos variando de acordo com a resposta imune dos animais ante a infecção (BANETH; AROCH, 2008). O período de incubação da doença é de difícil determinação, podendo variar de três meses até vários anos, e devem ser levados em conta fatores relacionados à condição individual dos animais, como o estado nutricional e a raça (BARBIÉRI, 2006; ALVAR *et al.*, 2004).

As lesões em cães são variadas, inespecíficas e incluem a linfadenopatia generalizada, crescimento desmedido das unhas, perda de pêlos ao redor dos olhos, nariz, boca e orelhas, lesões de pele com ou sem descamações e às vezes úlceras, perda de apetite ocasionando depressão e emagrecimento, ornicogrifose dificuldade de locomoção, febre, distúrbios de coagulação, lesões renais, hepáticas e lesões oculares (Figura 7).

2.4 Prevenção e Controle da Leishmaniose

O controle das leishmanioses nos dias de hoje está baseado: i) no extermínio de cães infectados que são reservatórios de parasitas em áreas peri domiciliares; ii) em medidas profiláticas de combate ao vetor; e iii) no tratamento farmacológico dos indivíduos infectados (MCGWIRE *et al.*, 2014).

A expansão da doença canina, associada ao domínio insuficiente dos parâmetros de controle da endemia, levaram as autoridades sanitárias do Brasil a direcionarem o controle da LV em humanos para a população canina, amparando-se no inquérito sorológico e na eutanásia dos animais soropositivos (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Como medidas preventivas para o homem e a população canina, o Ministério da



Figura 7 – Lesões apresentadas nos cães pelo aparecimento da leishmaniose visceral canina. Atrofia muscular, anemia e emagrecimento (A), dermatite, descamação, queda de pelo e ulcerações (B-D), crescimento desmedido das unhas (C).

Saúde no Brasil recomenda o uso de medidas de proteção pessoal com uso de repelentes, saneamento ambiental, controle da população canina errante, uso de telas em canis individuais e coletivos, uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em cães (Ministério da Saúde, 2011).

Nesse contexto, alternativas para a eutanásia dos cães têm sido propostas, como o uso de vacinas profiláticas para limitar e interromper a cadeia epidemiológica da transmissão da LV e o tratamento da doença nos cães (SILVA *et al.*, 2012).

Atualmente, existem duas vacinas contra a leishmaniose visceral canina, registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e comercializadas no Brasil, a vacina *Leish-tec*® e a vacina *Leishmune*® sendo que a licença da *Leishmune*® foi suspensa temporariamente, em 2014. O Ministério da Saúde preconiza a eutanásia de animais soro-reagentes, mesmo vacinados, que porventura sejam encontrados nas áreas de transmissão (Ministério da Saúde, 2011).

2.5 Diagnóstico da Leishmaniose

O diagnóstico das leishmanioses é feito por exame clínico e laboratorial dos pacientes, tais como exame parasitológico direto, teste intradérmico, exames sorológicos, imuno-histoquímica, reação em cadeia da polimerase (PCR), seguidos de hemograma e bioquímica sérica para acompanhamento de reações inespecíficas (BRASIL, 2005).

Em cães, são empregados o exame parasitológico direto e as técnicas sorológicas (Ministério da Saúde, 2011).

O diagnóstico clínico da LVC é precário e complexo, pois os sinais clínicos da doença são variáveis e inespecíficos, comuns à outras enfermidades que acometem o cão. A imunossupressão causada pela *Leishmania* pode gerar infecções oportunistas, dificultando também o diagnóstico da LV (SILVA, 2007).

2.6 Tratamento da Leishmaniose

O interesse comercial no desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos para doenças negligenciadas como a leishmaniose é limitado, porque o seu tratamento tem que ser acessível para garantir o acesso da população pobre afetada. Além disso, os avanços na compreensão da biologia de *Leishmania* não tem sido traduzidos satisfatoriamente em compostos quimioterapêuticos eficazes (CROFT *et al.*, 2006; SINDERMAN *et al.*, 2004). Fármacos que visam agentes patogênicos intracelulares devem ultrapassar as barreiras de membrana celular e manter-se intracelularmente, com nível terapêutico e por período de tempo desejado. Além disso, o desenvolvimento de multirresistência aos fármacos existentes é crescente, o que torna o tratamento intracelular da doença ainda mais desafiador.

Nas últimas décadas, alguns medicamentos alternativos ou novas formulações de ativos clássicos tornaram-se disponíveis, porém nenhum deles se mostrou ideal para o tratamento da leishmaniose devido à alta toxicidade e reações adversas graves, como disfunções gastrointestinais e arritmias, longa duração do tratamento ou pelo modo inadequado de administração, que leva ao abandono do tratamento. Além disso, os fármacos mais frequentemente utilizados, como o antimoniato de meglumina (AME), e a anfotericina B (AmB) não eliminam completamente os parasitas, gerando problemas de resistência (GRIENSVEN; BOELAERT, 2011; SUNDAR *et al.*, 2011).

2.6.1 Antimoniais Pentavalentes

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento de leishmanioses têm sido, até hoje, os antimoniais pentavalentes Sb^{5+} . Eles foram usados pela primeira vez pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, na sua forma trivalente (antimônio trivalente, Sb^{3+} , o chamado tártaro emético ou tartarato de potássio e antimônio, obtendo algum sucesso, visto

que naquela época 90 % dos casos evoluíam para óbito por não haver tratamento (LAINSON; RANGEL, 2005). No entanto, esta formulação apresentava toxicidade, ocasionando tosse, dor no peito e depressão. Além disso, era de difícil administração.

Em 1937, Smith introduziu a o estibogluconato de sódio *Pentostam*[®] um medicamento derivado do ácido estibônico, em que o antimônio está na forma pentavalente, Sb^{5+} . Desta forma, houve redução de alguns efeitos colaterais e da toxicidade, em relação tártaro emético. O ácido estibônico complexado a carboidratos (duas moléculas de ácido glicônico) é usado para o tratamento das leishmanioses em países de língua inglesa. Em países de língua francesa, espanhola e no Brasil, o fármaco utilizado é o antimoníato de meglumina, (*Glucantime*[®]) também um antimonial pentavalente (BERMAN *et al.*, 1986) (Figura 8).

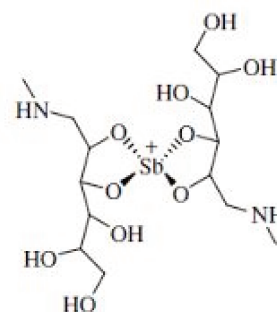


Figura 8 – Esquerda: *Glucantime*[®] forma comercial do antimoníato de meglumina. Direita: estrutura molecular do antimoníato de meglumina

Os antimônias têm mostrado eficácia variável contra a leishmaniose cutânea e visceral, e exigem a administração injetável, seja por via intravenosa, intramuscular ou intralinfática (MURRAY *et al.*, 2005).

Devido aos efeitos secundários, tais como elevada cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade os pacientes devem ser hospitalizados e monitorados, já que o tratamento pode ter que ser suspenso (MATOUSSI *et al.*, 2007; SHAHIAN; ALBORZI, 2009; ZAGHLOUL; AL-JASSER, 2004).

Os antimonias parecem ter um amplo mecanismo de ação. Os dados sugerem que o antimônio pentavalente Sb^{5+} entra nas células hospedeiras, atravessa a membrana fagolisossômica e é convertido em antimônio trivalente Sb^{3+} (FRÉZARD *et al.*, 2009). Acredita-se que o mecanismo anti-leishmania do Sb^{3+} está relacionado com a sua interação com biomoléculas que contenham grupos sulfidril, nos grupos tióis dos peptídeos, proteínas e enzimas (WYLLIE *et al.*, 2004). Então, o Sb^{3+} age contra os amastigotas, por comprometer o potencial redox dos tióis intracelulares, induzindo seu efluxo e, conseqüentemente, inibindo a tripanotona redutase (DENTON *et al.*, 2004).

A redução do Sb^{5+} pode ser não-enzimática (sob condições ácidas tais como as encontradas no fagolisossoma), induzida por glutatona, glicilcisteína e tripanotona, ou

enzimática pela redutase tiol-dependente (ASHUTOSH *et al.*, 2007) e antimoniato redutase (PATHAK; YI, 2001).

O Sb^{5+} também pode matar parasitas por mecanismos indiretos, como o aumento dos níveis de citocinas (LIMA *et al.*, 2009). Os antimoniais também podem causar danos ao DNA e inibição da topoisomerase I (CHEESMAN, 2000).

2.6.2 Anfotericina B

O Desoxicolato de anfotericina B AmB, *Fungizone*® é um antifúngico sistêmico também utilizado no tratamento para a leishmaniose, desde a década de 1960 (SAHA *et al.*, 1986). Devido à crescente resistência aos antimoniais, o AmB é usado como medicamento alternativo para a leishmaniose (ALVAR *et al.*, 2004).

É altamente tóxico, o que requer uma administração cuidadosa e lenta, por via intravenosa, já que frequentemente causa rigidez, calafrios e febre associada a miocardite e nefrotoxicidade (BERMAN, 2009).

O AmB liga-se ao ergosterol, o esteroide predominante na *Leishmania*, mas também reconhece o colesterol em células humanas, formando complexos que abrem poros na membrana, alterando o balanço iônico e provocando a morte celular (BASU; LALA, 2004).

2.6.3 Pentamidina

A pentamidina, é uma diamidina aromática, que apresenta atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (BERMAN *et al.*, 1986). O fármaco é muito tóxico e provoca efeitos adversos importantes, tais como a diabetes mellitus, a hipoglicemia grave, hipotensão, miocardite e toxicidade renal, podendo causar morte (SINGH *et al.*, 2012).

Este fármaco é atualmente pouco utilizado, devido ao aparecimento de casos de resistência (BRAY *et al.*, 2003), elevada toxicidade e baixa eficácia (JAIN; JAIN, 2013). O alvo celular da pentamidina é desconhecido, mas ela parece desempenhar um papel na mitocôndria, à medida que se acumula nesta organela (BRAY *et al.*, 2003).

2.6.4 Paromomicina

A Paromomicina é um antibiótico aminoglicósídico, extraído de *Streptomyces rimosus*, licenciado na Europa para o tratamento parenteral de infecções bacterianas. Seu mecanismo de ação consiste na inibição de síntese protéica, através de ligação às proteínas ribossômicas induzindo a leitura equivocada do RNA mensageiro. Desta forma, interfere no complexo de formação de peptídeos, causando ruptura dos polissomos em

monossomos não funcionais. A paromomicina possui um espectro de atividade parasitária, que não é apresentado por qualquer outro antibiótico aminoglicosídico (BERMAN, 2009).

É usada alternativamente contra a leishmaniose; de forma tópica para tratar a leishmaniose cutânea por via intravenosa, e contra a LV (JAIN; JAIN, 2013). No entanto, as formulações parenterais podem causar reações adversas graves, incluindo nefrotoxicidade e ototoxicidade e, mais raramente, hepatotoxicidade (FONG *et al.*, 1994; JAIN; JAIN, 2013). A paromomicina afeta o potencial de membrana mitocondrial, inibe a síntese proteica e leva à uma disfunção das vias respiratórias além de alterar a fluidez da membrana e o metabolismo lipídico (JHINGRAN *et al.*, 2009).

2.6.5 Miltefosina

A Hexadecilfosfocolina ou miltefosina (*Impavido*®) é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer. O fármaco vem sendo utilizado na Índia para o tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com antimoniais, apresentando resultados bastante promissores (SINDERMANN *et al.*, 2004) e é altamente utilizado no tratamento das leishmanioses, uma vez que pode ser administrado por via oral (SUNDAR; OLLIARO, 2007). Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostraram a eficácia deste fármaco para o tratamento de infecções por *L. donovani* (CROFT *et al.*, 1991).

2.6.6 Alopurinol

O alopurinol é um fármaco de segunda escolha no tratamento humano da leishmaniose (BANETH; SHAW, 2002). Ele pertence à classe das hipoxantinas e é amplamente usado na terapia da LVC, sozinho ou em combinação com outros fármacos, sendo eficiente na remissão dos sinais clínicos da LVC (SILVA *et al.*, 2012). Assim como o *Glucantime*®, também é contraindicado em casos de insuficiência renal, hepática ou cardíaca. Entre as reações adversas mais comuns destacam-se as reações cutâneas e de hipersensibilidade. Seu mecanismo de ação consiste na interferência no metabolismo das purinas (SILVA *et al.*, 2012). É um fármaco de baixo custo e possui a conveniência de ser administrado por via oral (BANETH; SHAW, 2002; SILVA *et al.*, 2012).

2.7 Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina

Atualmente tem sido bastante discutida a possibilidade de tratamento dos cães, infectados por leishmania, principalmente dos domésticos. A questão é controversa, pois se discute se o tratamento é eficaz para a “cura parasitológica” do animal, ou se somente fornece a “cura clínica”, mantendo o cão ainda como um reservatório do parasita. O tratamento destinado aos humanos não é recomendado para os cães pela toxicidade dos fármacos utilizados (BANETH; AROCH, 2008; BANETH; SHAW, 2002).

Em 2008, a portaria interministerial nº 1.426 proibiu a utilização de produtos de uso humano, registrados no mapa no tratamento de cães infectados pela *Leishmania* (BRASIL, 2005). No entanto, em 16 de janeiro de 2013 esta portaria foi derrubada, permitindo o tratamento dos cães infectados, e retirando a obrigatoriedade da eutanásia destes animais.

Os principais fármacos utilizados no tratamento da LVC são os antimonialis, AmB, alopurinol, pentamidina e recentemente, miltefosina (ALVAR *et al.*, 2004; SILVA, 2007; MIRÓ *et al.*, 2011).

Na tentativa de melhorar os resultados terapêuticos obtidos pelo tratamento convencional da LVC, principalmente os relacionados à redução da carga parasitária, tem ocorrido a busca constante por novos fármacos ou por novas formulações para os fármacos já consagrados, que tenham mais eficácia no tratamento da doença no cão (GOMES *et al.*, 2008).

Uma abordagem alternativa para o tratamento da LVC é a utilização de veículos de entrega de fármacos, tais como lipossomas. Este tipo de sistemas proporciona uma maior eficácia e segurança, uma vez os fármacos são adsorvidos ou encapsulados em transportadores, reduzindo a dose e reações adversas das formulações convencionais.

2.8 Lipossomas

Como veículos de entrega de fármacos, os lipossomas são microcápsulas de fosfolípidios organizados em bicamadas e de forma concêntrica, encerrando um espaço aquoso interno. Quando alguns lípidos são suspensos e agitados em excesso de solução aquosa, eles dão origem, espontaneamente, a uma população de vesículas que pode variar em diâmetro desde dezenas de nanômetros (nm) à dezenas de microns (μm); e no número de bicamadas lipídicas. Dependendo do tamanho e do número de lamelas, os lipossomas são classificados como vesículas grandes ou pequenas, uni ou multilamelares (SAMAD *et al.*, 2007).

Durante sua formação, o lipossoma encapsula parte do meio aquoso em que se encontra disperso, englobando as substâncias hidrofílicas presentes no meio. A bicamada, por sua vez, é capaz de acomodar moléculas hidrofóbicas e comporta-se como uma membrana semipermeável, em relação ao material encapsulado no cerne aquoso das vesículas. Além disso, algumas substâncias com caráter anfifílico podem se alojar na interface lamelar. Por essa versatilidade em carrear compostos solúveis em água e em lípidios, os lipossomas são considerados nanocarreadores de ampla aplicação (BAWARSKI *et al.*, 2008).

Os lipossomas são biodegradáveis, não tóxicos e capazes de interagir muito bem com as células devido à similaridade com membranas naturais, em termos de propriedades como transporte iônico, permeabilidade, propriedades de fusão, etc. Eles são também capazes de entregar fármacos, proteínas, enzimas, e material genético para células vivas (TORCHILIN, 2013).

A utilização dessas nanopartículas para a veiculação de fármacos protege o ativo de degradação, leva à redução da toxicidade do fármaco e possibilita tratamentos de liberação sustentada (LASIC, 1993).

Costuma-se classificar os lipossomas com base em suas propriedades físico-químicas ou mecanismo de ação em: catiônicos ou aniônicos, sensíveis ao pH, elásticos, imunolipossomas, entre outros (BAWARSKI *et al.*, 2008).

A classificação mais comum descreve os lipossomas em relação o número de bicamadas lipídicas concêntricas que possuem: multilamelares (MLV's do inglês *multilamellar vesicles*) ou unilamelares, que podem ser gigantes, grandes ou pequenos (GUV, LUV ou SUV), respectivamente, como pode se observar na figura 9 (TORCHILIN, 2013).

- Vesículas multilamelares grandes (MLV): consistem de varias bicamadas concêntricas e têm tamanho de 500 a 1000 nm.
- Vesículas unilameres grandes (LUV): têm unibicamadas e variação no tamanho de 200-800 nm.
- Vesículas unilamelares pequenas (SUV): formadas por uma bicamada simples e com tamanho de 20 a 100 nm.

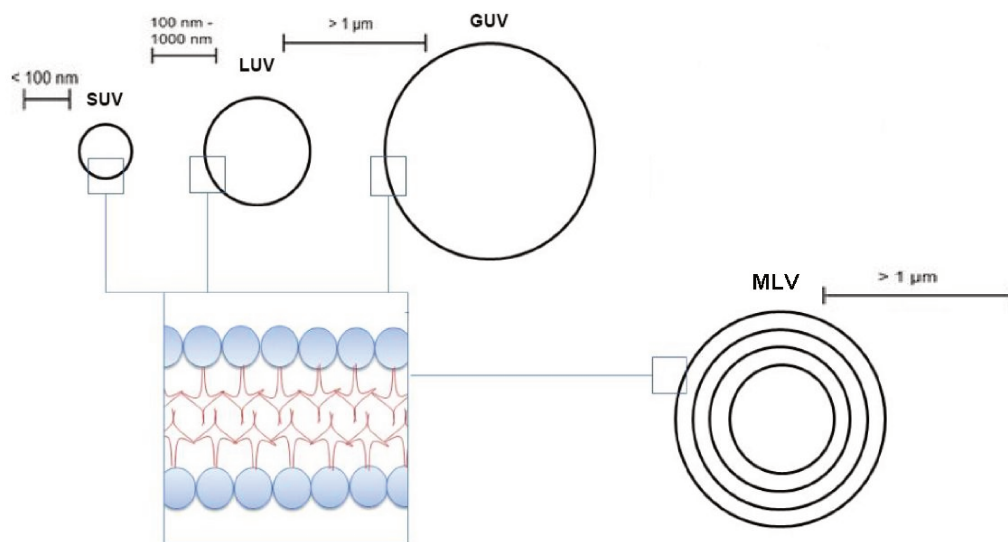


Figura 9 – Representação esquemática dos tipos de lipossomas (SUV, LUV, GUV e MLV), seus respectivos tamanhos e vista ampliada das bicamadas de fosfolípidios. (Adaptado de Fonseca-Santos, 2015)

As moléculas de fármacos podem ser encapsuladas no espaço aquoso interno do lipossoma ou ainda podem se intercalar entre os lipídios que compõem a bicamada, dependendo de suas características físico-químicas ou da composição dos lipídios que constituem o lipossoma (Figura 10). A capacidade dos lipossomas em aprisionar fármacos hidrofílicos e

hidrofóbicos com modulação de sua atividade, além de sua versatilidade e capacidade de modificação da sua superfície são os principais fatores responsáveis pela sua popularidade na pesquisa de entrega de fármacos.

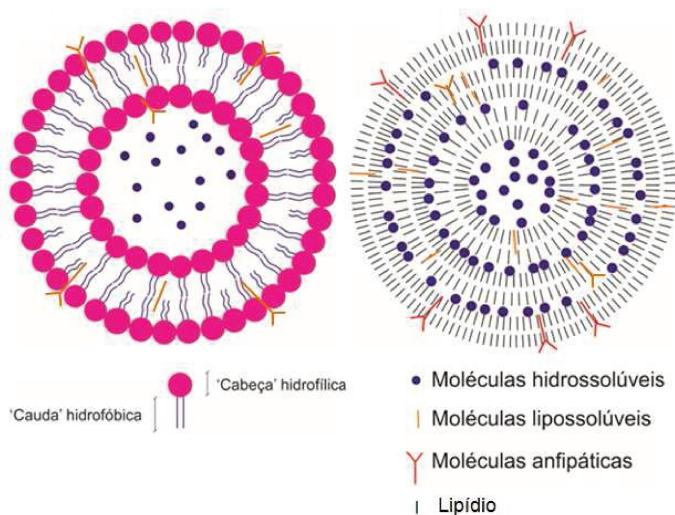


Figura 10 – Representação esquemática da organização de um lipossoma remetendo as possíveis formas de inserção de compostos hidrofílicos, lipofílicos e anfílicos. Esquerda: lipossoma unilamelar. direita: lipossoma multilamelar. (Adaptado de: De Araujo, 2008)

A função dos lipossomas como veículos é liberar os fármacos nele encapsulados em alvos específicos, evitando a toxicidade sistêmica das substâncias que ficam disponíveis no local de ação (GRANT; BANSINATH, 2001). Os lipossomas têm sido utilizados em imunoenaios (RONGEN *et al.*, 1997) e como sistemas de liberação sustentada para vários fármacos incluindo antivirais (LAW *et al.*, 2000), antifúngicos (KOTWANI *et al.*, 2002), medicamentos antineoplásicos (STUART *et al.*, 2000).

Em geral, várias propriedades influenciam o desempenho *in vivo* dos lipossomas, dentre os quais a composição lipídica, a temperatura de transição de fases dos fosfolípidios constituintes, o método de preparação, a lamelaridade, o tamanho e a carga superficial. Em 2013, cerca de 20 formulações lipossomais estavam em fases de ensaios clínicos, para serem lançadas no mercado, para o tratamento em humanos (ALLEN; CULLIS, 2013).

O fármaco encapsulado em lipossomas surge como alternativa de tratamento, uma vez que o princípio ativo fica protegido de eliminação e/ou degradação rápida pelo sistema celular do hospedeiro. Os lipossomas podem ser internalizados pela célula e a liberação lenta do fármaco no interior da célula alvo, potencializa sua ação e reduz efeitos secundários indesejáveis, como a toxicidade induzida por níveis plasmáticos altos (FRÉZARD *et al.*, 2000).

2.8.1 Lipossomas no Tratamento da Leishmaniose

Os lipossomas, depois de injeção intravenosa, são removidos rapidamente pelas células fagocíticas do baço e fígado (também denominado como direcionamento passivo) e, pelo menos em parte, são localizados nos lisossomos dessas células, o que tem estimulado cientistas a explorar sua aplicação para o tratamento de infecções intracelulares bacterianas e parasitárias (BAKKER-WOUDENBERG, 1995). De fato, uma das primeiras aplicações de lipossomas foi seu direcionamento para macrófagos, no tratamento de infecção por *Leishmania* (OWAIS; GUPTA, 2005).

A eficácia das formulações lipossomais no tratamento das leishmanioses está relacionada à tendência natural de remoção dos lipossomas da circulação sanguínea, através de fagocitose por macrófagos residentes no fígado, baço e medula óssea (FRÉZARD *et al.*, 2000). Desta forma, o fármaco carregado pelos lipossomas atinge como sítio de ação, os macrófagos.

Os lipossomas são mais bem estudados para tratamento da leishmaniose do que para qualquer outra doença parasitária, devido principalmente ao fato da *Leishmania* colonizar macrófagos, que são também responsáveis pela depuração de lipossomas *in vivo* (FRÉZARD *et al.*, 2000).

Assim, foi pensada a utilização de lipossomas convencionais para o direcionamento de fármacos anti-leishmaniose com a possível redução no seu perfil de toxicidade. Para a terapia da leishmaniose, como mencionado anteriormente os antimoniais são os fármacos de escolha, apesar de seus reconhecidos efeitos tóxicos. A eficácia de várias fármacos antimoniais como o AME ou estibogluconato de sódio quando encapsulados em lipossomas tem se mostrando superior nos lipossomas que a do fármaco livre (FRÉZARD *et al.*, 2000; KALAT *et al.*, 2014; SCHETTINI *et al.*, 2006; SINHA *et al.*, 2015).

Por exemplo, New e col. mostraram que o estibogluconato de sódio encapsulado em lipossomas aumentou sua atividade contra a leishmaniose cutânea em camundongos, quando os parasitas estavam localizados nos macrófagos de tecidos periféricos (NEW; CHANCE, 1980). Alving e col. demonstraram pela primeira vez a utilidade dos lipossomas no tratamento de LV em hamsters (ALVING *et al.*, 1978). Antimoniais encapsulados em lipossomas mostraram-se 700 vezes mais ativos do que o fármaco livre (não encapsulado), confirmando assim o potencial dos sistemas de lipossomas. Além disso, estudos de microscopia eletrônica revelaram uma dramática desintegração da *Leishmania* em células de Kupfer de hamster, após tratamento com agentes antimoniais lipossomais o que ocorre, possivelmente, como um resultado da fusão fagolisossômica (ALVING *et al.*, 1980a).

Considerando-se o problema da resistência associada com antimoniais, foram também feitos esforços para avaliar a eficácia de agentes de segunda linha, tais como (AmB) em formulação lipossomal, para o tratamento de todos os tipos de leishmaniose (BRAY *et al.*, 2003; HAMMARTON *et al.*, 2003; NYLÉN; GAUTAM, 2010). A AmB

lipossomal (L-AmB) foi 350-750 vezes mais ativa do que o AME, e de 2 a 5 vezes mais ativa do que a AmB não encapsulada, quando testada contra LV experimental. Além disso, quando testada em macacos-esquilo, a anfotericina B lipossomal (L-AmB) atingiu 99% de supressão de amastigotas de *Leishmania* no fígado com uma melhora concomitante no índice terapêutico da AmB (BODHE *et al.*, 1999).

Posteriormente, com a comercialização bem sucedida da L-AmB (*AmBiosome*®), a eficácia da L-AmB em seres humanos para o tratamento de leishmaniose cutânea e visceral foi testada por vários investigadores (AMATO *et al.*, 2004; BODHE *et al.*, 1999; MARTINO *et al.*, 1997; RUSSO *et al.*, 1996). Croft e col. utilizaram a L-AmB (*AmBiosome*®) no tratamento de pacientes que padeciam de LV e que estavam sofrendo de resistência a múltiplos fármacos (CROFT; COOMBS, 2003). Outros produtos à base de lípidos como o a dispersão coloidal de AmB (*Amphocil*®) e o complexo lipídico de AmB (*Amphotec*®) também mostraram-se eficazes contra a LV, porém, na maior parte dos estudos que compararam a eficácia das formulações de AmB a base de lipídios, a formulação lipossomal L-AmB mostrou-se superior aos outros, em estudos *in vivo* (YARDLEY; CROFT, 2000).

Subsequentemente, Papagiannaros e col. demonstraram vantagens do uso da miltefosina lipossomal sobre a miltefosina livre, como a melhora na susceptibilidade de promastigotas de *Leishmania* resistentes à miltefosina (PAPAGIANNAROS *et al.*, 2005).

Embora múltiplos fármacos encapsulados em lipossomas tenham sido usados para o tratamento dos diferentes tipos de leishmaniose, relatos que envolvam o direcionamento do fármaco ativo ao alvo em seres humanos só foram encontrados para a L-AmB (*AmBiosome*®) (CROFT; COOMBS, 2003; GRADONI *et al.*, 1993; RUSSO *et al.*, 1996).

Também há relatos de sucesso no tratamento com L-AmB para leishmaniose cutânea resistente ao tratamento com antimônio (TORRE-CISNEROS *et al.*, 1994) e para pacientes com LV infectados com o Vírus de Imunodeficiência Humana (VIH) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (LAZANAS *et al.*, 1993; RUSSO *et al.*, 1996).

Infelizmente, não há outras formulações propostas até agora que tenham o potencial de ser usadas amplamente como a AmB sob a forma de lipossomas. Assim, novos medicamentos e sistemas de distribuição precisam ser desenvolvidos para combater as epidemias da leishmaniose.

A Tabela 1 (Anexo) traz um levantamento detalhado dos trabalhos na literatura, envolvendo o uso de antimoniais encapsulados em lipossomas no tratamento da leishmaniose.

Como mostrado na tabela os primeiros relatos ocorreram na década de 1980, quando diferentes autores verificaram, em modelos de roedores e no cão, que as formulações lipossomais foram até 700 vezes mais eficazes no tratamento da LV, quando comparadas ao tratamento convencional com os antimoniais não encapsulados (ALVING *et al.*, 1980a), usando SUV de composição: distearoil-glicero-fosfocolina, colesterol, dodecilsfosfocolina, 5:4:1 mol %

lioofilizadas e depois reconstituídas por ressuspensão em tampão fosfato em pH 7,2 (ALVING *et al.*, 1980b)

Formulações lipossomais para três fármacos antileishmaniais: glucantime, miltefosina e paromomicina foram preparadas por Momeni e col. com diferentes composições de lipídios, usando um método modificado de emulsão/liofilização. A eficiência de encapsulação dos lipossomas preparados por esse método foi de até 90 %, porém os lipossomas tinham tamanho de distribuição bimodal, o que causou diminuição da porcentagem de encapsulação (% EE) para 50 % durante a filtragem de esterilização. Estes autores mostraram também que o efeito da carga de superfície é significativo sobre o processo de preparação, o tamanho dos lipossomas e a eficiência de encapsulação, apresentando maior eficiência de encapsulação e menor tamanho as formulações com carga negativa (-60 mV) (MOMENI *et al.*, 2013).

Borborema e col. desenvolveram formulações de AME lipossomal e determinaram sua atividade leishmanicida e absorção em macrófagos, mostrando que o valor concentração inibitória média (IC₅₀) com o antimoniato de meglumina liposomal (L-AME) foi 10 vezes menor que a do fármaco livre, apresentando ainda toxicidade reduzida nos macrófagos (BORBOREMA *et al.*, 2011). Usando L-AME com fosfatidilserina PS, Tempone e col. demonstraram uma alta eficácia *in vivo*, reduzindo em 133 vezes a dose de antimônio total administrada em hamsters infectados (TEMPONE; JR., 2008).

Até o momento não é de nosso conhecimento, estudos envolvendo a avaliação de lipossomas aniônicos, num sistema de infecção *in vitro* com *Leishmania infantum*.

3 JUSTIFICATIVA

O uso de formulações de liberação sustentada (*drug delivery*) baseadas em lipossomas tem sido propostas, para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos.

A proposta desenvolvida nesta dissertação foi baseada no desenvolvimento de uma formulação do AME encapsulado em lipossomas aniônicos (contendo fosfatidilserina, PS) na sua composição, e sua avaliação em macrófagos de cão (linhagem DH82), num sistema de infecção *in vitro* com *Leishmania infantum*.

Este sistema foi desenvolvido considerando a hipótese de aumento da solubilidade, de prolongamento da duração de ação e de redução da toxicidade celular apresentada pelo AME, bem como da diminuição da dose necessária deste, para reduzir a carga parasitária.

Embora vários trabalhos já tenham sido feitos na tentativa de melhorar a eficácia terapêutica do AME através de sua incorporação em lipossomas (Tabela 1-ANEXOS), nenhum deles ainda se mostrou eficaz para melhorar a adesão ao tratamento ou eliminar completamente os parasitas de cães portadores da LVC, sem recaída da doença.

Ressalta-se também um diferencial na composição dos lipossomas, que contém uma pequena fração de PS, para aumentar a internalização das vesículas pelos macrófagos (BORBOREMA *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos de LVC e investigações de fármacos são realizados *in vivo*, isto é, com cães naturalmente infectados, sem as condições experimentais controladas dos modelos *in vitro*, tais como as culturas de macrófagos infectados com *L. infantum*. Por outro lado, a maioria dos estudos de interação macrófago-leishmania e dos testes com candidatos a fármacos leishmanicidas são realizados com linhagens de macrófagos humanos e murinos (NYLÉN; GAUTAM, 2010). Considerando-se que a resposta de cães ao tratamento é diversa daquela de humanos, faz-se necessário o desenvolvimento de tratamentos, protocolos e ensaios, utilizando-se macrófagos de cão.

Por isso nesta dissertação foi adotada uma abordagem inovadora de aplicação de um sistema lipossomal aniônico, desenvolvido objetivando o tratamento de uma doença de importância médica e sanitária, num modelo *in vitro* de infecção de macrófagos de cão DH82 por *L. infantum*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Preparar e caracterizar formulações lipossomais para o fármaco antileishmania AME encapsulado em lipossomas (L-AME), compostos de fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol (CHOL) e fosfatidilserina (PS), bem como a avaliação de sua eficácia num modelo *in vitro* de infecção de macrófagos da linhagem canina DH82 com o parasita *L.infantum*.

4.2 Objetivos Específicos

Para alcançar o objetivo geral supracitado foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Preparação da formulação do AME, em lipossomas tipo LUV (L-AME composta dos lípidios EPC/CHOL/PS e o agente antioxidante α -tocoferol, na razão molar 4:3:0,04:0,07 mol%).
2. Caracterização físico-química do sistema L-AME em termos de tamanho das partículas, polidispersão, potencial zeta, porcentagem de encapsulação do fármaco e concentração de fosfolípidios.
3. Avaliação da eficácia *in vitro* do sistema lipossomal em culturas celulares de macrófagos DH82 infectados com a forma promastigota e amastigota do parasito *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1972/LD), em comparação com a eficácia do fármaco livre.
4. Realização de estudos de colocalização celular do parasito *Leishmania infantum* e do sistema lipossomal dentro dos macrófagos DH82.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta na primeira seção uma descrição dos materiais (reagentes, equipamentos, softwares e células) utilizados para o desenvolvimento deste projeto. A segunda seção apresenta os métodos realizados para atingir os objetivos planejados durante o desenvolvimento desta dissertação. A terceira seção mostra programas de análise estatística que foram usados para o processamento dos dados aqui mostrados.

Os experimentos realizados e os resultados obtidos na tentativa de desenvolvimento do complexo AME em ciclodextrinas podem ser encontrados, na seção de ANEXOS desta dissertação.

5.1 Materiais

5.1.1 Reagentes

- Antimoniato de meglumina, (AME) (SANOFI AVENTIS)
- Fosfatidilcolina de ovo, (EPC) (SIGMA-ALDRICH)
- Fosfatidilserina, (2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina), (PS) (SIGMA-ALDRICH)
- Colesterol, (CHOL) (SIGMA-ALDRICH)
- Acetato de alfa-tocoferol, (α -TOC) (SIGMA-ALDRICH)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio, (MTT) (SIGMA-ALDRICH)
- Meio de cultura celular para o crescimento de linhagens celulares de insetos (SCHNEIDER) (SIGMA-ALDRICH)
- Meio Eagle modificado por Dulbecco (DME) (NUTRICELL)
- Ácido clorídrico, (HCl)
- Tampão fosfato salino, (PBS)
- Clorofórmio
- Etanol
- Glicina
- Ácido tiobarbitúrico, (TBA)

- Tetraetoxipropano, (TEP)
- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado
- Ácido perclórico
- Fosfomolibdato de amônio, (FMA)
- Ácido ascórbico
- Uranila, (SIGMA-ALDRICH)
- Cloreto de sódio, (NaCl)
- Paraformaldeído, (PFA)
- Detergente Triton-X100
- Albumina sérica bovina, (ASB)
- Soro fetal bovino, (SFB)
- Anticorpo primário, (Anti-dog CD11c) (BiO-RAD)
- Anticorpo secundário, (Alexxa488) anti-mouse (Molecular Probes)
- Corante fluorescente para contraste nuclear, (TO-PRO-3) (Molecular Probes)
- Gentamicina, (SIGMA-ALDRICH)
- Tripsina, (SIGMA-ALDRICH)
- Urina humana masculina
- Corante celular azul de tripan, (SIGMA-ALDRICH)
- Fixador de lâminas, Entellan (SIGMA-ALDRICH)
- Metanol
- Corante celular, Giemsa (SIGMA ALDRICH)
- Tampão HEPES para uso em cultura celular (SIGMA-ALDRICH)
- Dodecilsulfato de sódio (SDS)
- Ácido nítrico
- Peróxido de hidrogênio
- Ácido acético glacial
- Formalina

5.1.2 Equipamentos

- Extrusora, (Lipex Biomembranes Inc.)
- Ultracentrífuga, (*Beckman*[®] *Coulter*)
- Espectrofotômetro UV-vis, (*Varian*[®] *Cary50*)
- Microscópio eletrônico de transmissão, (*Zeiss*[®] *LEO50*)
- Analisador de tamanho de partículas e potencial zeta por espalhamento de luz (DLS), (*ZetaSizer*[®] *NanoZS90*) (Malvern Instruments Co.)
- Difratorômetro de raios-X, (*Rigaku*[®] *RINT2100*)
- Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear, (*Bruker*[®] *AvanceIII400MHz*)
- Microscópio óptico, (*Zeiss*[®] *PrimostarAxiocam*)
- Microscópio óptico invertido, (Olympus Optical Co.)
- Shaker, (*GoShaker*[®])
- Cabine de segurança biológica (*Pachane*[®] *PA420*)
- Leitor de placas
- Bomba vácuo
- Estufas para crescimento celular (27°C e 37°C) (*labcientifica*[®] *SL101* e *Brunswick*[®] *Galaxy48R*)
- Agitador magnético (*Gostirrer*[®] *MS – H – Pro*)
- Balança Analítica (*Shimadzu*[®] *AY220*)
- Centrífuga, (*Eppendorf*[®] *5130*)
- Meio de montagem para cobertura de tecidos marcados com fluorocromos, (*Dako*[®], USA)
- Microscópio confocal, (*Leica*[®] *TCSSP5*)
- Câmara de Neubauer
- Citômetro de fluxo
- Bloco digestor
- Autoclave (*Sercon*[®] *AHMC*)
- Extrusora

- Banho Maria (*Precision*[®])
- Espectrômetro de absorção atômica
- pHmetro (*Quimis*[®])
- Banho seco (*Novatecnica*[®])

5.1.3 Softwares

- Programa de processamento de imagem, projetada para imagens científicas multidimensionais, ImageJ, NIH.
- Programa para análise de leitura de placas por espectrometria UV_{vis}, KC4-. (*BIO – TEK*[®]).
- Programa de obtenção de imagens, Axio-vision 4,3 (*Zeiss*[®]).

5.1.4 Células

- Formas celulares promastigotas e amastigotas do parasito *Leishmania Infantum* (MHOM/BR/1972/LD), gentilmente cedidos pela Dra. Clara L. Barbieri Mestriner, Universidade Federal de São Paulo.
- Macrófagos DH82, linhagem de macrófagos caninos proveniente do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (ATCC nacional).

5.2 Métodos

Esta seção está dividida em duas subseções a primeira é denominada como Ensaios Químicos, na qual é apresentado o desenvolvimento da formulação lipossomal L-AME, desde seu preparo até a realização dos testes de caracterização físicoquímica. A segunda subsecção é denominada como Ensaios Biológicos, a qual aborda os ensaios realizados com as culturas celulares de macrófagos DH82 e parasitos *L.infantum*, incluindo os experimentos de proliferação e toxicidade celular.

Os seguintes diagramas (Figuras 11 e 12) mostram os ensaios e testes realizados para a avaliação físicoquímica e biológica do sistema lipossomal L-AME.

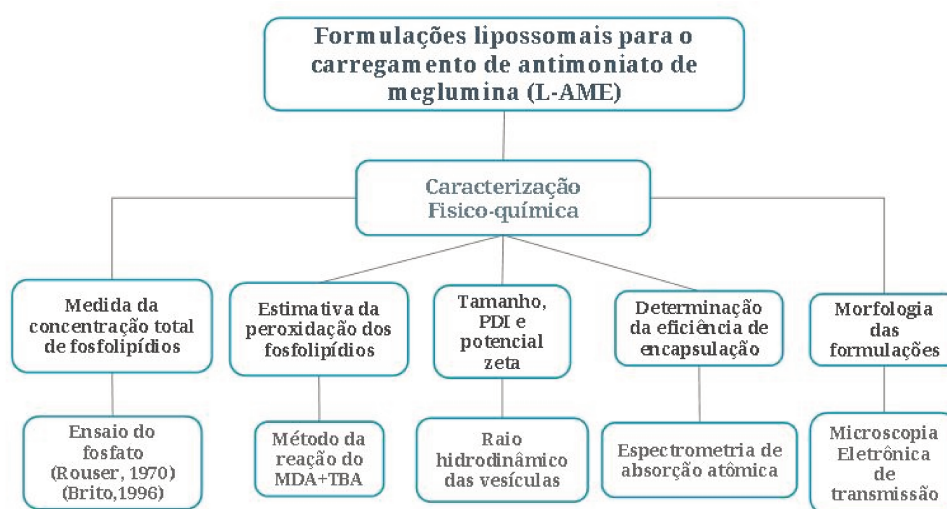


Figura 11 – Diagrama da caracterização físicoquímica realizada ao sistema lipossomal L-AME.

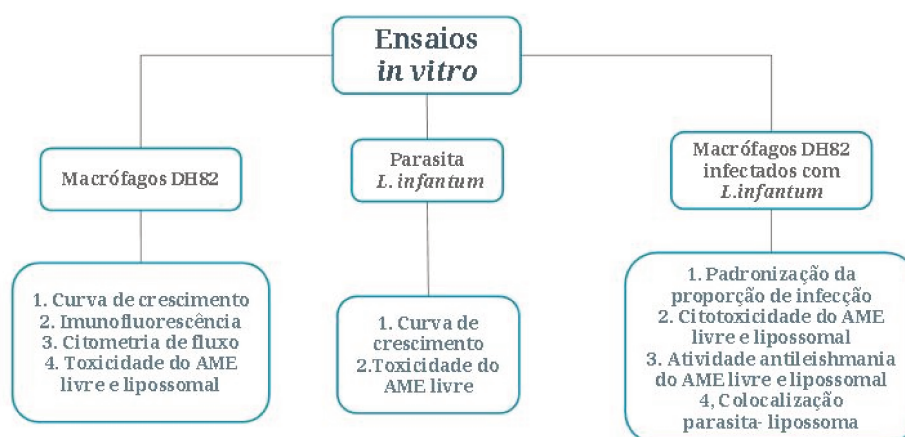


Figura 12 – Diagrama dos ensaios *in vitro* realizados aos macrófagos *DH82* e os parasitos *Leishmania infantum*, para a avaliação biológica do sistema lipossomal L-AME.

5.2.1 Ensaios Químicos

5.2.1.1 Lipossomas para o carregamento do antimoniato de meglumina (L-AME).

Lipossomas multilamelares (5 mM de lipídios totais), foram preparados pelo método de hidratação de filme seco de lipídios. Alíquotas de EPC, CHOL, PS e α -tocoferol foram pipetadas de soluções estoque em clorofórmio (grau de pureza $\geq 99\%$), para uma proporção molar final de 4:3:0,4:0,07 mol %, respectivamente.

Em seguida as alíquotas foram evaporadas sob fluxo de N_2 e mantidas sob vácuo por 2 h à temperatura ambiente, para retirada do clorofórmio residual. Após secagem, o filme lipídico aderido à parede do tubo foi ressuspensão em tampão HEPES 20 mM, pH 7.4 contendo AME, na concentração 0,01 M e agitado em vortex (3 min) obtendo a formação de MLV.

As LUV foram obtidas por extrusão das MLV, sob pressão de N_2 (3,0 kgf/cm² ou 40 psi) à temperatura ambiente, isto é acima da temperatura de transição de fases da EPC (-5 °C); passando-se a amostra de MLV 12 vezes por uma extrusora, contendo um disco de drenagem e duas membranas de polycarbonato com poros de tamanho controlado (0,4 μ m) com o intuito de que obter homogeneidade no tamanho das vesículas obtidas.

Posteriormente a suspensão lipossomal foi submetida a esterilização durante 121 °C/5 min para eliminar microrganismos que pudessem causar contaminação durante os ensaios biológicos, foi usada esta temperatura considerando o ponto de fusão do fármaco (128-132 °C) e estudos de esterilização de formulações lipossomais realizados previamente no laboratório de Biomembranas IB/UNICAMP (CEREDA *et al.*, 2008), foram realizadas medições de peroxidação, distribuição de tamanho, polidispersão e potencial zeta das vesículas estéreis para verificar o efeito do processo de esterilização nos lipossomas.

5.2.1.2 Medida da Concentração Total de Fosfolipídios

A concentração total de fosfolipídios foi medida através do ensaio de fosfato, segundo o método descrito por Rouser e col. (ROUSER *et al.*, 1970), com modificações introduzidas por (BRITO *et al.*, 1996).

Foi preparada uma solução de (Na_2HPO_4) 1 mM, a partir da qual foram pipetados para tubos falcon alíquotas de 10, 30, 60 e 90 μ L para uma curva de calibração.

Em paralelo foram pipetados 50 μ L dos lipossomas e 450 μ L de tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 para outros tubos falcon. Todas as amostras foram mantidas em estufa pelo período de uma noite para secagem do material. Após secagem, foram adicionados aos tubos 50 μ L de ácido perclórico $HClO_4$ concentrado. Os tubos foram, então, colocados em bloco digestor a 180 °C por 1 h. Em seguida, foram adicionados 900 μ L de reagente de trabalho (contendo fosfomolibdato de amônio e ácido ascórbico em meio ácido conforme a tabela 1), sob agitação e os tubos foram levados ao aquecimento em banho-maria a 45 °C de 15 a 20 min. Em seguida,

foram medidas as absorvâncias das amostras e padrões da curva de calibração em 795 nm em espectrofotômetro UV-vis, utilizando reagente de trabalho e ácido perclórico como branco (para zerar o equipamento). Foi calculada a quantidade de fosfolipídio presente na formulação através da comparação das leituras das amostras com as leituras do padrão.

Para o reagente de trabalho foram utilizados:

Tabela 1 – Componentes do reagente de trabalho

Reagente	Quantidade
Molibdato de Amônio	0,1757 g
Água	38 mL
Ácido ascórbico	3,8 g
Ácido sulfúrico	1,1 mL

Para determinar a concentração de fosfolipídio nos lipossomas foram aplicadas às seguintes fórmulas:

$$X = \frac{Abs}{B} \quad (5.1)$$

Onde X corresponde aos moles da substância, Abs ao valor de absorvância e B o valor do *slope* obtido da curva padrão.

$$M = \frac{X}{Vm} \quad (5.2)$$

onde M corresponde a molaridade, X aos moles da substância obtidos da fórmula anterior e Vm volume de lipossomas adicionados para a medição.

5.2.1.3 Medida da Distribuição de Tamanho, Polidispersão e Potencial Zeta (ζ -) dos Lipossomas

As medidas de espalhamento de luz (light scattering) são muito importantes na estimativa do tamanho, forma e interação de partículas lipossomais, além de ser esta uma técnica que oferece vantagens como rapidez das medidas, não interferir no sistema e promover análise representativa das amostras, uma vez que o número de partículas é relativamente grande.

O princípio da técnica considera que quando um feixe de luz é direcionado a uma suspensão coloidal ou dispersão, parte dessa luz pode ser absorvida, parte é dispersa e a restante é transmitida através da amostra. A luz dispersa ou “espalhada” (scattered) resulta de um campo elétrico associado à luz incidente, induzindo oscilações periódicas na nuvem eletrônica dos átomos do material analisado, que são detectadas pelo aparelho ao longo de um intervalo de tempo; a dinâmica das oscilações permite calcular o raio hidrodinâmico e a distribuição das partículas (SHAW, 1992).

O equipamento utilizado para determinar o tamanho dos lipossomas (Zeta Sizer) também mede o potencial zeta das partículas. Quase todos os materiais macroscópicos ou particulados adquirem uma carga elétrica superficial quando estão em contato com um líquido. O potencial zeta é um indicador dessa carga e é importante nos estudos de química de superfície, visto que pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Sua medida é obtida a partir de fenômenos decorrentes da movimentação das partículas em relação ao meio em que estão dispersas, provocando o rompimento da dupla camada elétrica, no plano de cisalhamento (USKOKOVIC *et al.*, 2010).

Foram realizadas medidas do raio hidrodinâmico das vesículas lipossomais em equipamento (*ZetaSizer*[®]*NanoZS90*), utilizando o método de espalhamento dinâmico de luz), as medidas foram feitas na ausência e presença de AME nas concentrações (0-0,005-0,001-0,01 M), com o objetivo de verificar o tamanho médio, potencial zeta (ζ -) e a homogeneidade das suspensões lipossomais antes e após a encapsulação do fármaco.

Estas medições foram feitas com vesículas lipossomais não estéreis, e esterilizadas, para verificar o efeito deste processo na estabilidade das partículas lipossomais.

As formulações foram diluídas em água Milli-Q na proporção de 25 μ L das formulações para 975 μ L de água. Foram realizadas as varreduras de cada amostra e as medidas de tamanho (nm) e potencial zeta (ζ -,mV) foram obtidas à 25 °C, em equipamento (*ZetaSizer*[®]*NanoZS90*), com um ângulo de detecção de 90°. Essas medidas foram também usadas para avaliar a estabilidade das formulações fazendo medições frequentes durante seis meses de armazenagem, a 4 °C.

5.2.1.4 Morfologia das Formulações: Microscopia Eletrônica de Transmissão

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para analisar diretamente a morfologia das amostras contendo ou não L-AME estéreis e não estéreis.

A fim de preparar o material para a microscopia, uma gota da suspensão lipossomal (5 mM) foi adicionada a uma grade de ouro. Após 10 s, o excesso da amostra foi retirado com papel filtro, e em seguida, uma gota de solução aquosa de uranila a 2 % (p/p) foi adicionada sobre a mesma. Após 8 s, o excesso foi novamente retirado com papel filtro e, na sequência, uma gota de água MilliQ foi adicionada à grade, seguindo-se o mesmo procedimento para a retirada do excesso, após 5 s. A grade permaneceu em repouso, em temperatura ambiente, até a secagem das amostras. Esses experimentos foram feitos no Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/Unicamp.

5.2.1.5 Estimativa da Peroxidação de Fosfolipídios

Por apresentarem constituição semelhante às membranas celulares, os lipossomas também são suscetíveis aos efeitos da peroxidação lipídica (ESTEPA *et al.*, 2001). Os lipossomas

usados neste trabalho foram constituídos majoritariamente de EPC, cujos ácidos graxos apresentam grau variado de saturação (GROBAS *et al.*, 2001). A retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia acila, etapa inicial da oxidação, pode ser o resultado de exposição à radiação eletromagnética ou à contaminação por metais de transição.

A estabilidade química e física dos lipossomas é um importante fator a ser considerado para sua utilização eficaz como veículos de formulações farmacêuticas. Quaisquer alterações na natureza de seus componentes refletem mudanças de propriedades como a permeabilidade da bicamada e interações entre as vesículas (agregação e/ou fusão).

Algumas medidas preventivas devem ser utilizadas para evitar a peroxidação lipídica dos lipossomas como: estocagem ao abrigo da luz (proteção contra fotoperoxidação) e em baixas temperaturas (preferencialmente a 4 °C), redução dos níveis de oxigenação na amostra (utilização de vácuo ou substituição do ar por nitrogênio), além de evitar a exposição à irradiação (LICHTENBERG; BARENHOLZ, 2006) e uso de agentes redutores como o tocoferol.

Os produtos da peroxidação lipídica apresentam natureza instável, portanto a avaliação de seus níveis é realizada através da determinação de metabólitos dos lipoperóxidos, sendo necessário considerar alguns fatores no processo de oxidação como: conjugação de duplas ligações; formação de peróxidos e produção de aldeídos de alta reatividade, especialmente o malondialdeído (MDA).

Existe uma variedade de métodos analíticos desenvolvidos para determinar o dano oxidativo dos lipídios (quantificação de hidroperóxidos, dienos conjugados e endoperóxidos ou peróxidos cíclicos), dentre eles, o mais comumente utilizado baseia-se na reação, em altas temperaturas, do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um cromóforo vermelho que pode ser detectado por absorção visível *Vis* (em 532 nm) ou por fluorescência, sendo o método específico para determinação de endoperóxidos (OHKAWA *et al.*, 1979).

Para a realização do teste, foi determinada uma curva de calibração com o padrão de tetraetoxipropano (TEP) em concentrações que variaram de 0,01 a 0,12 mM. Em seguida, foram retiradas alíquotas das amostras (MLV) a serem analisadas, adicionando-se os seguintes reagentes: cloreto férrico (0,3 % reagente catalizador), hidroxitoluenobutilado (BHT) (0,2 %, reativo antioxidante), tampão glicina (0,2 M, pH 3.6), TBA (0,5 %, reativo cromogênico) em solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) (0,3 %).

As amostras foram colocadas em banho a 100 °C por 15 min e, posteriormente, foram resfriadas em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se ácido acético glacial e clorofórmio (1:2 v/v) e então, foram centrifugadas até separação das duas fases (500 xg/20 min, 4 °C). A absorbância do sobrenadante foi medida (532 nm) e comparada com a da curva padrão de TEP.

5.2.1.6 Determinação da Eficiência da Encapsulação

A Eficiência da encapsulação (%EE) foi avaliada pela quantificação do antimônio total encapsulado dentro dos lipossomas, através da técnica de espectrometria de absorção atômica (EAA). Amostras de L-AME (LUV) foram submetidas a ultracentrifugação ($120.000 \times g/2 \text{ h}$, 10°C). O antimônio total foi avaliado no *pellet* e no sobrenadante das amostras. O *pellet* e o sobrenadante foram separados em tubos de ensaio e se realizou digestão adicionando uma alíquota de ácido nítrico concentrado (HNO_3 65 % v/v).

O processo de digestão consistiu na hidrólise ácida dos fosfolípidios e outros materiais orgânicos e, conseqüentemente, da liberação do analito (*Sb* que estava encapsulado nos lipossomas).

Os tubos foram acondicionados em bloco digestor e mantidos à 90°C por 1 h. Adicionou-se 0,45 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30 % v/v) em cada tubo e retornou-se para o bloco digestor por mais 40 min/ 90°C . Após serem retirados do bloco digestor, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e o conteúdo foi transferido quantitativamente para balões volumétricos de 10 mL completando o volume com ácido nítrico a 0,2 % (v/v).

Para a dosagem por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite as amostras foram previamente diluídas em água *MilliQ*, de modo a obter concentrações compatíveis com a curva de absorção (10 mg/L, 20 mg/L e 30 mg/L).

As análises foram realizadas no laboratório

5.2.2 Ensaios Biológicos

5.2.2.1 Macrófagos da linhagem DH82

Macrófagos DH82 foram cultivados em meio de cultura celular de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 0,1 % de gentamicina e 10 % de soro fetal bovino (SFB) e incubados em estufa com 5 % de CO_2 , 21 % de O_2 e N_2 balanceado, a 37°C . Para remoção das células dos frascos de cultura, foi realizada a tripsinização das células, (3 mL de tripsina, 1 min), com posterior liberação das células da superfície usando espátula de raspagem celular, com adição de 7 mL de meio de cultura, para neutralização do processo de tripsinização (Salerno Pimentel *et al.*, 2012). A centrifugação das células desta linhagem, para remoção de resíduos foi feita a 79 g, $4^\circ\text{C}/15 \text{ min}$.

5.2.2.1.1 Contagem dos Macrófagos DH82

Os macrófagos aderidos em placas de cultivo foram cultivados em placas de cultura de 24 poços. Para os ensaios de viabilidade celular os macrófagos aderidos em poços foram tripsinizados e centrifugados. As células foram diluídas em corante azul de tripan, fazendo a contagem em câmara de Neubauer, com microscópio óptico em aumento de 40X.

5.2.2.1.2 Curva de Proliferação dos Macrófagos DH82

As células foram cultivadas em frascos de 25cm^2 , 1×10^5 macrófagos DH82 em 10 mL de meio DMEM incubadas durante 24 dias, a troca do meio de cultura foi realizada a cada 8 dias de incubação. Amostras das culturas de macrófagos, foram retiradas com um intervalo de 3 dias, realizando-se prévia tripsinização. As suspensões foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS), para contagem em câmara de Neubauer, usando microscópio óptico em aumento 40X, os valores obtidos foram expressos como logaritmo del número de células/mL.

5.2.2.2 Imunofluorescência dos Macrófagos DH82

Para confirmar o fenótipo dos macrófagos caninos DH82, as células foram incubadas com anticorpo primário *Mouse Anti-dog anti-CD11c* (1:100 v/v), anticorpo secundário *alexa 488-anti mouse* (1:500 v/v) e o corante de núcleo TO-PRO-3 (1:500 v/v). O anticorpo primário *Mouse Anti-dog anti-CD11c* reconhece o antígeno canino de superfície celular CD11c, membro da família das alfa integrinas, é expresso por monócitos, granulócitos e por células dendríticas e é produzido em camundongos. A marcação foi realizada para análises de imunofluorescência microscopia confocal.

Os macrófagos DH82 foram aderidos em placas de 12 poços ($1,5 \times 10^5$ cel/poço) contendo lamínulas circulares de vidro e incubados em estufa a 37°C , por 24 h. As lamínulas foram lavadas com tampão PBS 1 M, fixadas por 20 min com solução acetona/metanol (1:1 v/v) a 4 % na temperatura ambiente, e lavadas mais três vezes com PBS. Após 24 h, as lamínulas foram lavadas uma vez com PBS incubadas com tampão PBS contendo glicina (0,1 M) por 20 min e lavadas novamente com PBS.

A permeabilização das células foi feita com solução do detergente Triton-X100 (0,2 %) em PBS por 2 min, e tampão de bloqueio albúmina sérica bovina (ASB) 10 % por 5 min. As lamínulas foram transferidas para uma câmara úmida contendo $35\ \mu\text{L}$ do anticorpo primário (*Mouse Anti-dog CD11c*) diluído em tampão de bloqueio (1:400 v/v) durante 1 hora. Após lavagens com PBS adicionou-se o tampão de bloqueio por 1 min e as células foram incubadas com anticorpo secundário (*Alexa 488 anti-mouse*) e marcador de núcleo TO-PRO-3, por 30 min. Após lavagens as lamínulas foram montadas com meio de montagem Dako. As imagens foram analisadas usando microscópio confocal (INFABIC IFGW/Unicamp).

As imagens foram adquiridas usando pinhole configurado a uma unidade aérea para cada canal, de maneira sequencial, e analisadas no software ImageJ.

5.2.2.3 Análise por Citometria de Fluxo da linhagem de Macrófagos DH82

Foram usadas células de linhagem de cão (DH82) e células de linhagem murino (J774), com o intuito de avaliar as características dos macrófagos caninos (DH82), pela expressão da proteína CD11c a través da afinidade e especificidade do anticorpo primário

(*Mouse Anti-dog anti-CD11c*), de forma que as células J774, foram usadas como controle negativo do experimento.

Foram feitas três formas de marcação: uma população de células marcadas só com anticorpo primário (*Mouse Anti-dog anti-CD11c*), outra só com anticorpo secundário (Alexa 488 Anti-mouse) e finalmente uma última população com marcação dupla com os dois anticorpos (*Alexa 488 Anti-mouse*).

Foram ressuspensas aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/mL (DH82 e J774) em PBS gelado, 10 % de SFB e 1 % de azida sódica. Foi usado gelo para manter as soluções e as células a 4 °C e a azida de sódio foi usada para impedir a modulação e internalização de antígenos de superfície o que poderia causar perda de intensidade de fluorescência.

Foram adicionados 100 μ L da suspensão de células que foram incubados com 0,1-10 mg/mL do anticorpo primário (*Mouse Anti-dog anti-CD11c*) durante 30 min à 4 °C no escuro. Após o tempo as células foram lavadas por centrifugação e ressuspensas em PBS gelado.

O anticorpo secundário marcado com fluoróforo (*Alexa 488 Anti-mouse*) e em 3 % de BSA/PBS foi incubado com as células durante 30 min a 4 °C no escuro. As células foram lavadas por centrifugação e ressuspensas em PBS gelado.

A suspensões de células foram armazenadas imediatamente à 4 °C no escuro. As células foram analisadas em citômetro de fluxo.

5.2.2.4 Cultura dos parasitos de *L.infantum*

Os promastigotas foram cultivados em meio de cultura para o crescimento de linhagens celulares de insetos (Schneider) contendo 0,1 % de gentamicina, 10 % de SFB e 5 % de urina humana masculina, e mantidos em estufa de 26 °C (MAIA *et al.*, 2007).

5.2.2.4.1 Contagem dos parasitos de *L.infantum*

Suspensões com células promastigotas foram diluídas em formalina 0,1 %, para fixação, e contadas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico, com objetiva 40X.

5.2.2.4.2 Curva de proliferação de Promastigotas de *L.infantum*

Cerca de 2×10^6 células promastigotas/mL em 10 mL de meio Schneider foram cultivadas em frasco de cultura de 25cm^2 e incubadas a 26 °C durante 8 dias. Amostras da suspensão foram retiradas dos frascos e fixadas em solução de formaldeído 0,5 %, e os parasitos contados em câmara de Neubauer, usando-se microscópio óptico.

5.2.2.5 Ensaio de Infecção dos Macrófagos DH82 com *L.infantum*

Para padronizar o ensaio de infecção, macrófagos DH82 foram infectados com as formas promastigota e amastigota de *L. infantum*. Os ensaios foram realizados incubando-se as células uma placa de 24 poços, com 1×10^5 macrófagos/mL, aderidos à lamínulas.

As proporções parasita:célula testadas foram de 5:1; 10:1 e 20:1, e a incubação foi durante 24 h, em estufa com 5 % de CO_2 , 21 % de O_2 e N_2 balanceado, a 37 °C.

As lamínulas foram lavadas com PBS duas vezes, fixadas com metanol e coradas com Giemsa, diluído em solução tampão fosfato 1M, pH 7,0, na proporção Giemsa: solução tampão 1:20 v/v. As lamínulas foram aderidas em lâminas de vidro fosco com fixador Entellan.

Vinte campos aleatórios das lamínulas, ou 200 células, em cada uma das lamínulas, foram avaliadas quanto ao número total de células, o número total de células infectadas e o número total de amastigotas intracelulares.

5.2.2.6 Ensaios de Citotoxicidade e Viabilidade Celular

As células (macrófagos e macrófagos infectados) foram tratadas com concentrações de AME livre e lipossomal L-AME, para determinar seu efeito na manutenção da viabilidade celular e diminuição da carga parasitária dos macrófagos DH82.

5.2.2.6.1 Toxicidade do AME em Promastigotas de *L. Infantum*

Foi verificada a efetividade do AME na sua forma livre determinando-se a porcentagem de células viáveis em promastigotas de *Leishmania infantum*(*l.infantum*).

Promastigotas foram plaqueados na concentração 10^6 células/mL em placas de cultura de 24 poços, e tratados com soluções de AME livre (nas concentrações 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 M), (filtradas em filtro de 200 μ m, para evitar contaminação e suspendidas em meio de cultura Schneider. As placas foram incubadas a 26 °C. Os resultados foram obtidos da contagem em câmara de Neubauer, após 48 e 96 h dos tratamentos.

5.2.2.6.2 Citotoxicidade do AME e do AME lipossomal (L-AME) em macrófagos DH82

Com o objetivo de verificar a citotoxicidade de diferentes concentrações tanto do AME livre quanto na forma lipossomal L-AME foi determinada a porcentagem de células DH82 viáveis após tratamento. Para isto foram realizados o método de exclusão por meio da coloração com azul de tripan e teste de redução do MTT.

A viabilidade celular foi determinada por meio da coloração com azul de tripan, por se tratar de uma metodologia rápida, de fácil realização e de baixo custo. O método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido a diminuição da seletividade, permitindo

que o corante se difunda no interior do citoplasma da célula. Assim, as células não viáveis exibem coloração azul, após tratamento. Esta técnica permite avaliar a integridade física da membrana da célula, porém não fornece informação sobre a atividade capacidade metabólica celular (CASAROTO *et al.*, 2012).

Para o teste de coloração por azul de tripan foram semeadas 2×10^5 células/ mL em placas de cultura estéreis de 24 poços (sem lamínula de vidro). As células foram tratadas com soluções de AME (livre) (nas concentrações: 0,001; 0,005; 0,05; 0,01 e 0,1 M), e suspensões de AME lipossomal (L-AME) (nas concentrações: 0,0001; 0,001 e 0,01 M). As células foram incubadas a 37 °C com 5 % CO_2 , e analisadas após 48 e 96 horas.

Para as análises o meio de cultura foi retirado, e as células foram tratadas com tripsina, bloqueando-se o processo com meio de cultura. Em seguida as células foram misturadas numa solução de corante azul de tripan (0,3 %). As células foram contadas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico e objetiva de 40x, anotando-se o número de células totais e o número de células "azul de tripan positivas" consideradas como células não viáveis.

A redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] (MTT) é outro método colorimétrico rápido, usado para medir a proliferação e a viabilidade celular. O MTT é absorvido pelas células por endocitose e a redução do seu anel tetrazólico (de cor amarela) resulta na formação de cristais de formazan de cor azul, que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais. A fração oxidada do corante em solução pode ser medida, fotometricamente 570 nm (SUMANTRAN, 2011).

Para o teste de redução do MTT as células foram plaqueadas (10^5 células/ poço) em placa de 96 poços estéreis e incubadas a 37 °C com 5 % de CO_2 . As células foram tratadas com soluções de AME (livre) (nas concentrações: 0,001; 0,005; 0,05; 0,01 e 0,1 M, previamente estabelecidas e suspensões de AME lipossomal (L-AME) (nas concentrações: 0,0001; 0,001 e 0,01 M). As culturas celulares foram incubadas a 37 °C com 5 % de CO_2 , e analisadas após 48 e 96 h.

Completado o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente, as células foram lavadas com solução salina estéril, e foi adicionado meio de cultura novo (sem tratamento) e solução de MTT (5 mg/mL), incubando-se pelo pernoite. No dia seguinte foi adicionada uma alíquota de solução 0,1 N de HCl em isopropanol por poço, para solubilização do formazan. A absorbância correspondente a cada poço foi lida no leitor de placas, em 570 nm.

5.2.2.6.3 Atividade Antileishmania do AME livre e AME lipossomal (L-AME) em macrófagos DH82 infectados com *L. infantum*.

Após infecção dos macrófagos caninos DH82 com *L. infantum*, as células foram tratadas com soluções de AME (livre) e L-AME, (nas concentrações: 0,0001; 0,001 e 0,01

M). As células tratadas foram incubadas a 37 °C, por 48 e 96 h. Transcorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS estéril à temperatura ambiente, fixadas com metanol, coradas com solução corante Giemsa e observadas em microscópio óptico (100x), foram contados 200 macrófagos por lamínula. Foram considerados na contagem: o número de macrófagos totais, o número de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófago. Também se realizou uma contagem independente na qual se anotou o número de macrófagos totais presentes em 20 campos aleatórios de cada lamínula, com o intuito de avaliar a viabilidade celular dos macrófagos infectados após os tratamentos.

5.2.3 Estudos de colocalização intracelular lipossoma-parasita.

Foram realizados estudos de colocalização intracelular dentro dos macrófagos DH82 dos lipossomas LUV's com o parasito *Leishmania infantum* usando-se microscopia confocal. Os lipossomas foram feitos como indicado anteriormente no item 5.2.1.1 misturando aliquotas dos lipídios (EPC/CHOL/PS) e colocando adicionalmente el lipídio marcado NDB-PE (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl ammonium salt) na proporção total de lipídios 4:0,4:3:0,04 mol%.

Foram usados parasitos *L. infantum* expresando a proteína fluorecente *m-cherry*, doados gentilmente pelo Dr. Daniel Ruiz do Laboratório de leishmaniose IB/UNICAMP.

Foi também marcado o núcleo dos macrófagos DH82 com o marcador de núcleo DRAQ5.

Inicialmente foram realizadas infecções macrófago-*L.infantum* (*m-cherry*) como indicado no item 5.2.2.5 durante 24 h posteriormente realizou-se o tratamento com os lipossomas marcados com NDB-PE durante 2,4,6 e 8 h, posterior a este tempo as amostras foram analisadas por microscopia confocal, avaliando-se o número de colocalizações célula-parasito depois de cada um dos tempos de incubação (usando o programa de processamento de imagens ImageJ). Foram tomadas micrografias para corroborar qualitativamente o sinal emitido pela fluorescência quanto do parasita e do lipossoma.

5.2.4 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como médias e desvio padrão (DP) dos experimentos realizados.

Os experimentos com células e parasitos foram feitos três vezes independentemente em triplicata. Nos testes *in vitro*, os valores de porcentagem para o ensaio de viabilidade celular foram comparados por análise de variância de uma via (*one way* ANOVA).

Os softwares utilizados foram: Origin Pro 8.5 (originLab Corporation, 1991-2010) e Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software Inc., versão 6,1, 2012).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo encontram-se os resultados obtidos a partir dos ensaios químicos e biológicos, além de sua discussão e análise.

6.1 Ensaios Químicos

6.1.1 Lipossomas para carregamento de AME

Vesículas lipossomais de 400 nm (LUV, 5mM) foram obtidas por a hidratação do filme seco e posterior extrusão. Os lipossomas foram compostos de EPC, CHOL, PS e α -tocoferol, na proporção 4:3:0,4:0,07 mol %, contendo AME nas concentrações 0,001, 0,005 e 0,01 M).

6.1.2 Medida da Concentração Total de Fosfolipídios

Obteve-se uma curva padrão de calibração, com diferentes concentrações de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), mediante medição espectrofotométrica da absorbância (UV *vis*) à 795 nm, com um valor $r=0,9991$ (Figura 13).

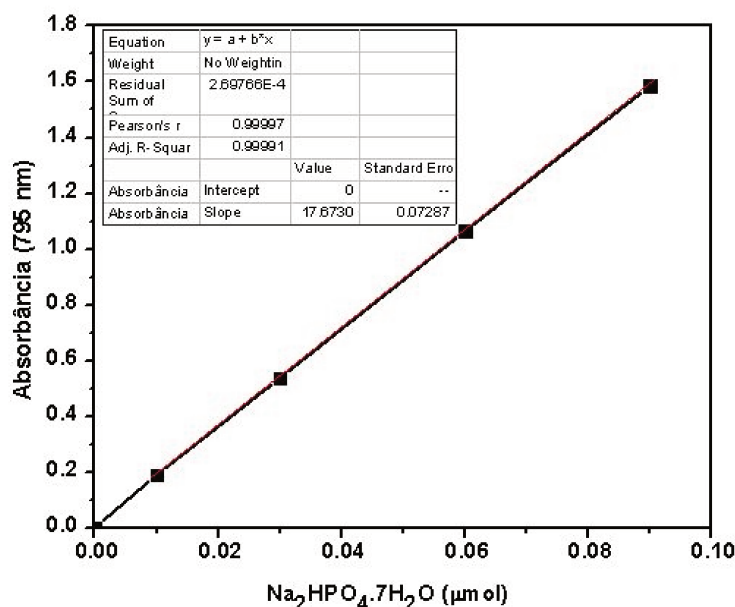


Figura 13 – Curva padrão de calibração de fosfato inorgânico ($r=0,99991$), realizada por medição espectrofotométrica da absorbância (UV *vis*) à 795 nm.

Pela curva padrão foi determinada a concentração de fosfolipídio (2,84 mM) valor que se aproxima ao valor teórico da concentração de fosfolipídios adicionados na formulação

(3 mM) somando-se as concentrações dos fosfolipídios EPC e PS presentes na formulação.

6.1.3 Medida da Distribuição de Tamanho e Potencial Zeta (ζ -) dos Lipossomas

Medidas de tamanho, polidispersão e potencial elétrico de superfície foram usadas para análise da estabilidade dos lipossomas LUV (5 mM) não estéreis contendo ou não diferentes concentrações de AME (0,001; 0,005 e 0,01M) e de lipossomas estéreis sem e com 0,01 M de AME ao longo do tempo de armazenamento (6 meses-4 °C) como mostrado nas figuras 14 e 15.

As medidas das formulações lipossomais não estéreis contendo AME no tempo inicial de análise mostraram diâmetro médio de $200 \pm 4,5$ nm para 0,001 M, $257,6 \pm 12$ nm para 0,005M e $279,03 \pm 3,4$ nm para 0,1 M. os tamanhos foram aumentado progressivamente, em comparação com o lipossoma controle, cujo tamanho encontrado foi de $108,9 \pm 1,8$ nm, na medida que a concentração de fármaco encapsulado era maior, o que mostra que o tamanho do lipossoma foi influenciado pela presença do fármaco. Também foi observado que durante o tempo de armazenamento as formulações foram aumentando de tamanho gradativamente atingindo após seis meses tamanhos não superiores aos 400 nm nas maiores concentrações de AME testadas (0,005 e 0,01 M) (Figura 14 e tabela 2).

As medidas da formulação lipossomal estéril com 0,01 M de AME apresentaram inicialmente um diâmetro médio de 339 nm ($DP \pm 10,9$), apresentando-se maior em comparação com o lipossoma estéril controle (sem fármaco) que mostrou um tamanho de $270,2 \pm 3,7$ nm, e após o tempo total de armazenamento o tamanho máximo encontrado nos lipossomas estéreis (0,01 M) foi de $433 \pm 4,3$ nm. Os lipossomas estéreis (controle e com fármaco) apresentaram tamanhos maiores, quando comparados com as formulações não estéreis, podendo ser possivelmente atribuído ao efeito do processo de esterilização (alta temperatura e calor úmido) (Figura 15 e tabela 3).

Kikuchi e col. apresentaram evidencias que o método de esterilização convencional pelo calor (120 °C/20 min) não afeta a estabilidade química ou a taxa de encapsulação de lipossomas contendo fármacos (KIKUCHI *et al.*, 1991), igualmente Zuidam e col. encontraram que lipossomas com ou sem fármacos lipofílicos e termoestáveis podem ser esterilizados por autoclavagem (ZUIDAM *et al.*, 1993).

Em ambos casos (Figuras 14 e 15) houve aumento do tamanho dos lipossomas com diferentes concentrações de fármaco encapsulado durante os 180 dias de armazenamento, os resultados mostraram estabilidade no tamanho das formulações testadas, não superando o tamanho estabelecido como objetivo da pesquisa (400 nm), evidenciado-se a viabilidade das formulações para o uso e continuidade nos ensaios físicoquímicos e biológicos propostos no trabalho.

O índice de polidispersão (PDI) foi também analisado mostrando valores que não

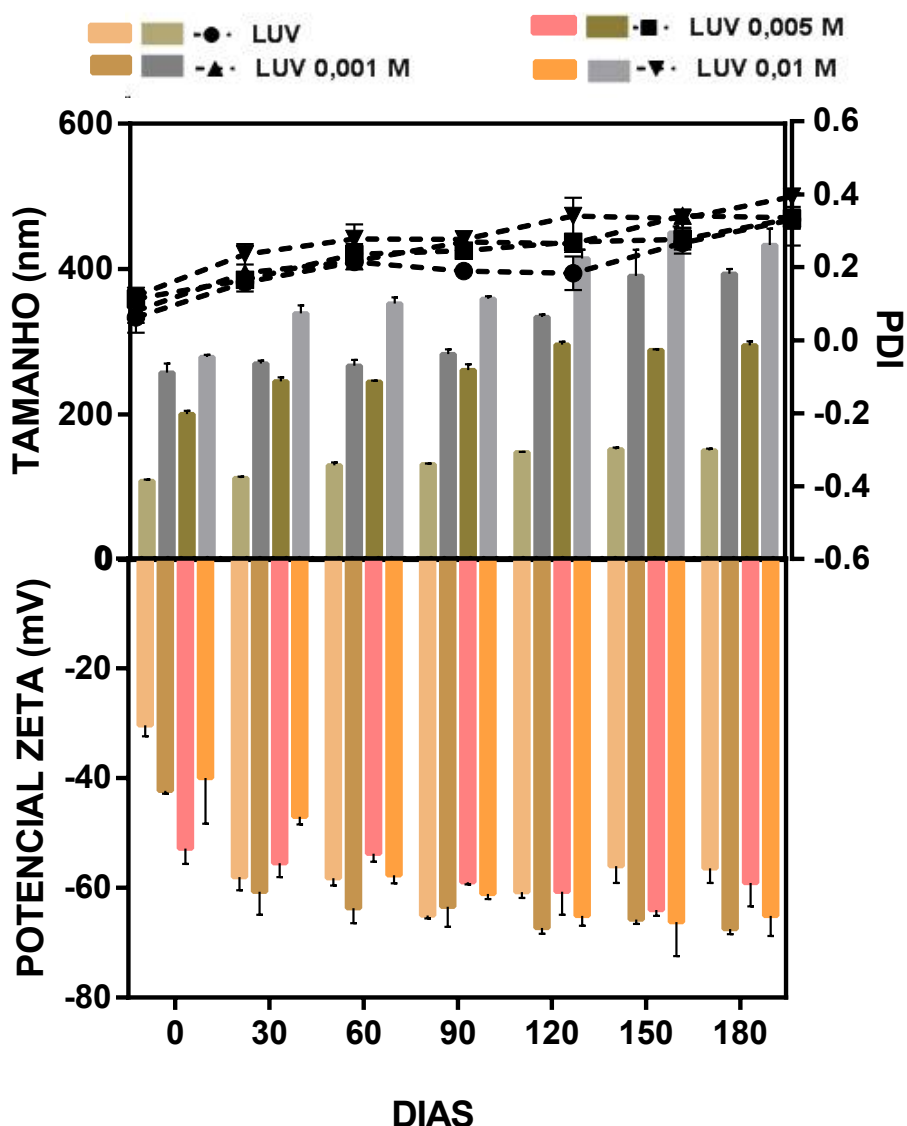


Figura 14 – Medidas do diâmetro médio (nm) obtidas por distribuição de intensidade (barras superiores), índice de polidispersão (PDI-tracejado), e potencial zeta (ζ -) (barras inferiores), das vesículas lipossomais (5 mM) não estéreis, encapsulando ou não AME (0; 0,001; 0,005 e 0,01 M), em função do tempo de armazenamento (180 dias-4 °C), obtidas por DLS. (n=3).

ultrapassaram $0,4 \pm 0,007$ durante todo tempo de armazenamento das formulações não estéreis, mostrando pouca polidispersão, homogeneidade e estabilidade das vesículas lipossomais em quaisquer das concentrações de AME analisadas. Já com as formulações lipossomais estéreis foram encontrados valores de polidispersão de até $0,8 \pm 0,08$ no último mês da análise, mostrando instabilidade da formulação ao longo do tempo (Figura 15).

O potencial zeta mostrou-se negativo em todas as formulações estéreis e não estéreis contendo ou não AME, com valores entre $-40\text{mV} \pm 6,7$ e $-65\text{mV} \pm 0,1$, foi observado que as

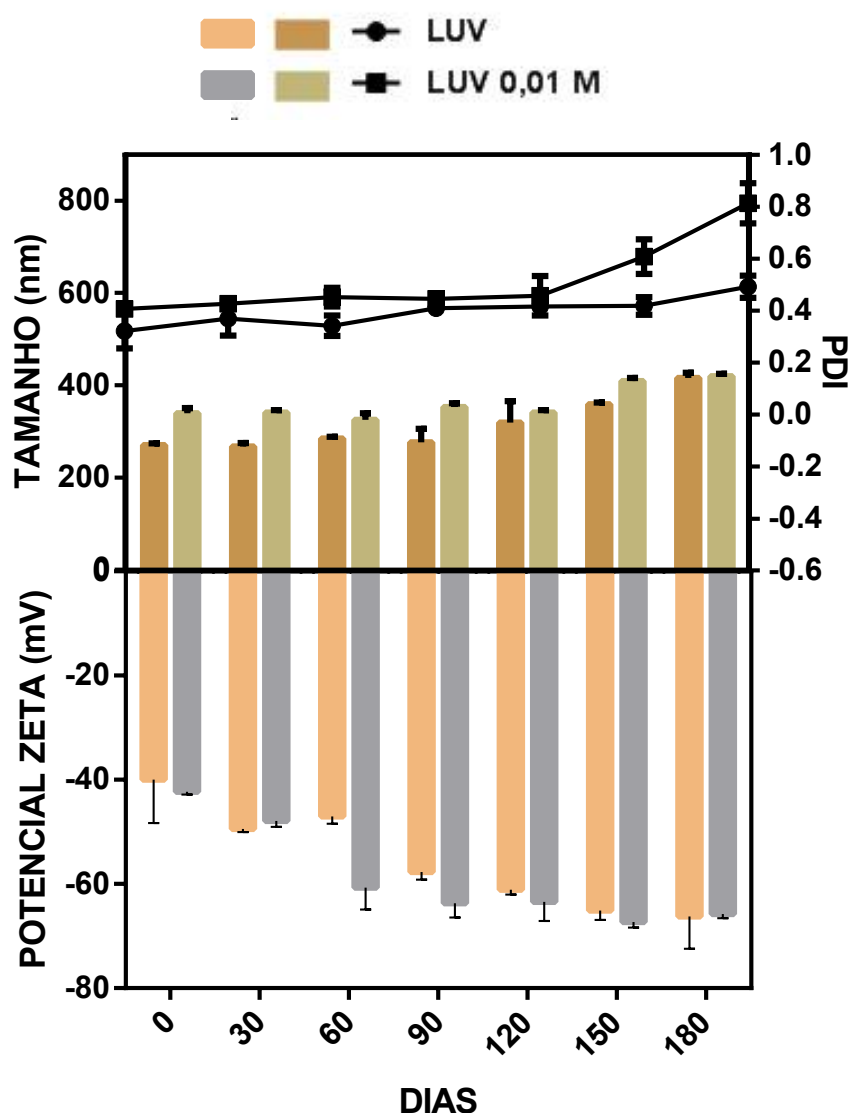


Figura 15 – Medidas do tamanho (barras superiores), índice de polidispersão (PDI-tracejado), e potencial zeta (ζ -) (barras inferiores) das vesículas lipossomais (5 mM) estéreis LUV encapsulando ou não AME (0 e 0,01 M), durante 180 dias, obtidas por DLS. (n=3).

vesículas encapsuladas com AME apresentavam um valor de potencial zeta mais negativo quando comparadas com as vesículas sem fármaco e a negatividade do potencial era proporcional à concentração do fármaco encapsulado. O potencial zeta apresentou-se negativo devido à presença do fosfolípido fosfatidilserina na membrana externa dos lipossomas (que confere carga negativa às vesículas).

Tabela 2 – Medidas do diâmetro médio das formulações lipossomais LUV não estéreis sem e com diferentes concentrações de AME (0; 0,001; 0,005 e 0,01 M) em função do tempo de armazenamento (180 dias-4 °C). Análise estatístico realizado com o teste ANOVA duas vias/tukey (teste de comparações múltiplas). (n=3). Valores de significância estatística: $p < 0,0001$ (****), $p < 0,001$ (***), $p < 0,05$ (*). Análises estatísticas realizadas: 1- comparação da variação dos valores do diâmetro médio das diferentes formulações encapsuladas respeito ao controle em cada um dos tempos de armazenamento (representada pelas letras) 2- comparação da variação dos valores do diâmetro médio de cada uma das formulações (controle e encapsulada) ao longo do tempo respeito ao tempo inicial (0)(representada pelas letras mais números).

<i>Formulações lipossomais não estéreis</i>				
	<i>LUV controle</i>	<i>LUV 0,001 M</i>	<i>LUV 0,005 M</i>	<i>LUV 0,01 M</i>
<i>Tempo (dias)</i>	<i>Média (nm) ± DP (significância estatística Test ANOVA duas vias/ Tukey)</i>			
0	108,9 ± 1,8	200,7 ± 4,5 (a****)	257,6 ± 12,6 (b****)	279,0 ± 3,4 (c,d1****)
30	112,5 ± 2,0	245,9 ± 5,1 (d,b2****)	270,4 ± 1,6 (e****)	339,4 ± 10,9 (f,d2****)
60	130,1 ± 3,8	245,1 ± 1,5 (g,b3****)	267,3 ± 7,8 (h****)	352,8 ± 8,2 (i,d3****)
90	131,9 ± 0,97	261,1 ± 8,3 (j****,b4****)	283,1 ± 6,7 (k****,c4*)	359,1 ± 3,7 (l,d4****)
120	148,26 ± 0,30 (a1***)	296,2 ± 3,8 (m***,b5****)	334,1 ± 3,5 (n,c5****)	414,8 ± 11,7 (o,d5****)
150	152,3 ± 2,4 (a2****)	288,9 ± 0,8 (p,b6****)	390,7 ± 36,01 (q,c6****)	450,1 ± 8,6 (r,d6****)
180	150,5 ± 2,97 (a3****)	295,3 ± 5,3 (s,b7****)	393,5 ± 6,78 (t,c7****)	433,0 ± 22,71 (u,d7****)

a****= LUV 0,001 M vs LUV controle, tempo 0 dias, (p<0,0001). b****= LUV 0,005 M vs LUV controle, tempo 0 dias, (p<0,0001). c****= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 0 dias, (p<0,0001). d****= LUV 0,001 M vs LUV controle, tempo 30 dias, (p<0,0001). e****= LUV 0,005 M vs LUV controle, tempo 30 dias, (p<0,0001). f****= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 30 dias, (p<0,0001). g****= LUV 0,001 M vs LUV controle, tempo 60 dias, (p<0,0001). h****= LUV 0,005 M vs LUV controle, tempo 60 dias, (p<0,0001). i****= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 60 dias, (p<0,0001). j****= LUV 0,001 M vs LUV controle, tempo 90 dias, (p<0,0001). k****= LUV 0,005 M vs LUV controle, tempo 90 dias, (p<0,0001). l****= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 90 dias, (p<0,0001). m****= LUV 0,001 M vs LUV controle, tempo 120 dias, (p<0,001). n****= LUV 0,005 M vs LUV controle, tempo 120 dias, (p<0,0001). o****= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 120 dias, (p<0,0001). p****= LUV 0,001 M vs LUV controle, tempo 150 dias, (p<0,0001). q****= LUV 0,005 M vs LUV controle, tempo 150 dias, (p<0,0001). r****= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 150 dias, (p<0,0001). s****= LUV 0,001 M vs LUV controle, tempo 180 dias, (p<0,0001). t****= LUV 0,005 M vs LUV controle, tempo 180 dias, (p<0,0001). s****= LUV 0,005 M vs LUV controle, tempo 180 dias, (p<0,0001). u****= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 180 dias, (p<0,0001). a1***= LUV controle, 120 dias vs LUV controle 0 dias, (p<0,001). a2****= LUV controle, 150 dias vs LUV controle 0 dias, (p<0,0001). a3****= LUV controle, 180 dias vs LUV controle 0 dias, (p<0,0001). b2****= LUV 0,001 M, 30 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,0001). b3****= LUV 0,001 M, 60 dias vs LUV controle 0 dias, (p<0,0001). b4****= LUV 0,001 M, 90 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,0001). b5****= LUV 0,001 M, 120 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,0001). b6****= LUV 0,001 M, 150 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,0001). b7****= LUV 0,001 M, 180 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,0001). c4*= LUV 0,005 M 90 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,05). c5****= LUV 0,005 M, 120 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,0001). c6****= LUV 0,005 M, 150 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,0001). c7****= LUV 0,005 M, 180 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,0001). d1****= LUV 0,01 M, 0 dias vs LUV controle, 0 dias, (p<0,0001). d2****= LUV 0,01 M, 30 dias vs LUV controle, 0 dias, (p,<0,0001). d3****= LUV 0,01 M, 60 dias vs LUV controle, 0 dias, (p,<0,0001). d4****= LUV 0,01 M, 90 dias vs LUV controle, 0 dias, (p,<0,0001). d5****= LUV 0,01 M, 120 dias vs LUV controle, 0 dias, (p,<0,0001). d6****= LUV 0,01 M, 150 dias vs LUV controle, 0 dias, (p,<0,0001). d7****= LUV 0,01 M, 180 dias vs LUV controle, 0 dias, (p,<0,0001).

Tabela 3 – Medidas do diâmetro médio das formulações lipossomais LUV estéreis sem e com AME (0; 0,01 M) em função do tempo de armazenamento (180 dias-4 °C). Análise estatística realizada com o teste ANOVA duas vias/tukey (teste de comparações múltiplas). n=3. Valores de significância estatística: p<0,0001 (****), p<0,001 (***), p<0,01 (**) p<0,05 (*). Análises estatísticas realizadas: 1- comparação da variação dos valores do diâmetro médio da formulação encapsulada respeito ao controle em cada um dos tempos de armazenamento (representada pelas letras); 2- comparação da variação dos valores do diâmetro médio das formulações (controle e encapsulada) ao longo do tempo respeito ao tempo inicial (0), (representada pelas letras mais números).

<i>Formulações; lipossomais estéreis</i>		
	<i>LUV controle</i>	<i>LUV 0,01M</i>
<i>Tempo (dias)</i>	<i>Média ± DP (significância estatística Test ANOVA duas vias/ Tukey</i>	
0	270,2 ± 3,7	339,4 ± 10,9 (a**)
30	267,3 ± 7,8	341,1 ± 4,6 (b****)
60	284,4 ± 4,2	324,9 ± 14,1
90	276,6 ± 28,9	352,8 ± 8,2 (d****)
120	319,1 ± 46,2	341,1 ± 4,6 (e1*)
150	359,1 ± 3,7	409,1 ± 6,8 (f*,f1****)
180	415,8 ± 11,3	419,4 ± 5,2 (g1****)

a**= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 0 dias, p<0,01 (**). b****= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 30 dias, p<0,001 (****). d****= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 90 dias, p<0,001 (****) f*= LUV 0,01 M vs LUV controle, tempo 150 dias, p<0,05 (*). e1*= LUV 0,01 M, tempo 120 dias vs LUV controle, tempo 0 dias p<0,05 (*). f1****= LUV 0,0001 M, tempo 150 dias vs LUV controle, tempo 0 dias, p<0,0001 (****). g1****= LUV 0,0001 M, tempo 180 dias vs LUV controle, tempo 0 dias, p<0,0001 (****).

6.1.4 Morfologia das formulações: Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na análise de MET foram encontradas vesículas lipossomais grandes (LUV) esféricas, bem delineadas tanto para as formulações não estéreis e estéreis e com tamanhos próximos ao determinado por DLS, aproximadamente 200 nm para as vesículas não estéreis e 395 nm para as vesículas estéreis como pode ser observado na figura 16. Além disso, as microfotografias evidenciam que a presença do fármaco e o processo de esterilização não alterou a estrutura lipídica dos lipossomas.

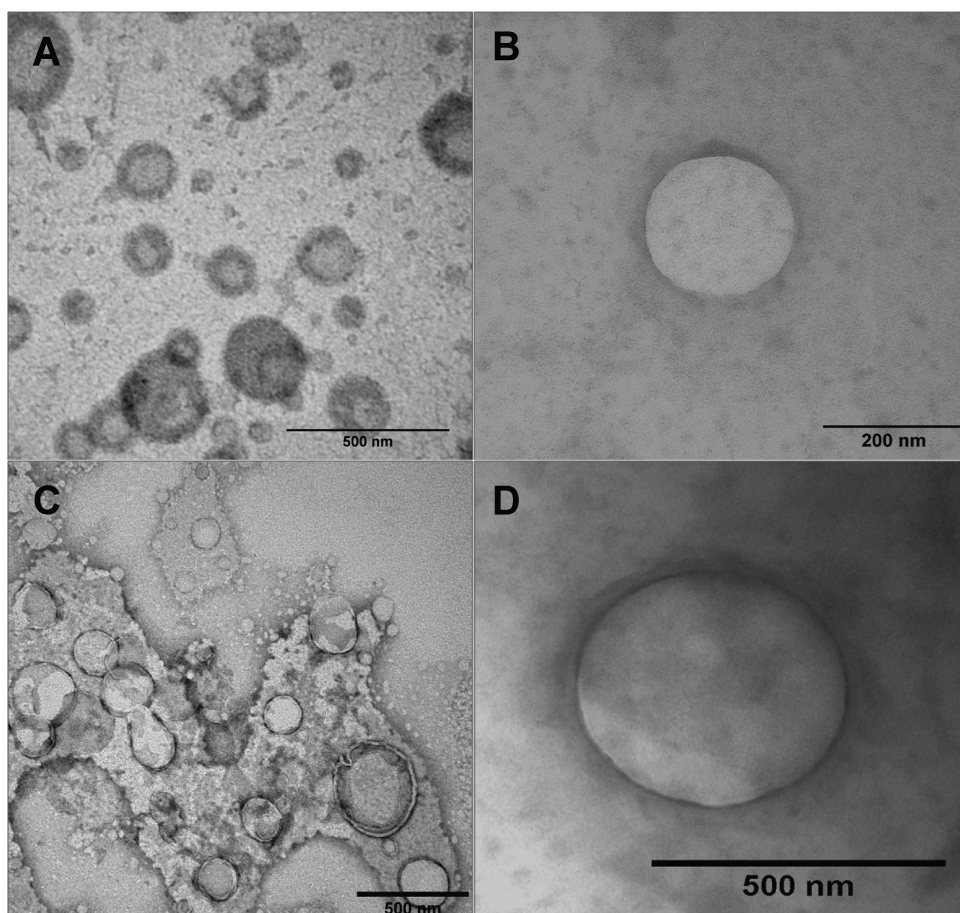


Figura 16 – Microfotografias das vesículas lipossomais contendo AME. (A-B) Formulação não estéril. (C-D) Formulação estéril. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, por coloração negativa das vesículas com uranila.

Lipossomas sem AME mostraram, tamanho aproximado de 200 nm, sendo um pouco menores que as vesículas lipossomais com AME encapsulado que apresentaram um tamanho aproximado de 300 nm. Não foram evidenciados processos de agregação das vesículas.

6.1.5 Estimativa da Oxidação de Fosfolipídios

A formação de endoperóxidos foi utilizada para monitorar a estabilidade química dos lipídios das formulações. Realizou-se a curva de calibração obtida a partir das leituras de

absorbância de diferentes alíquotas do reagente TEP e ácido perclórico em diferentes concentrações (mM), como mostrado na figura 17.

Através desta curva de calibração se calculou a percentagem de lipídios oxidados nas formulações de lipossomas não estéreis e estéreis, contendo ou não AME encapsulado. Como pode-se observar na tabela 4, os lipossomas estéreis (com AME encapsulado ou não), apresentaram uma percentagem de oxidação de lipídios (0,06%) maior que dos lipossomas não estéreis (0,01%). Mesmo assim, a percentagem de oxidação de lipídios não foi maior que o 1% da concentração total de lipídios presentes na formulação, indicando que o processo de esterilização não comprometeu a estabilidade química da formulação lipossomal.

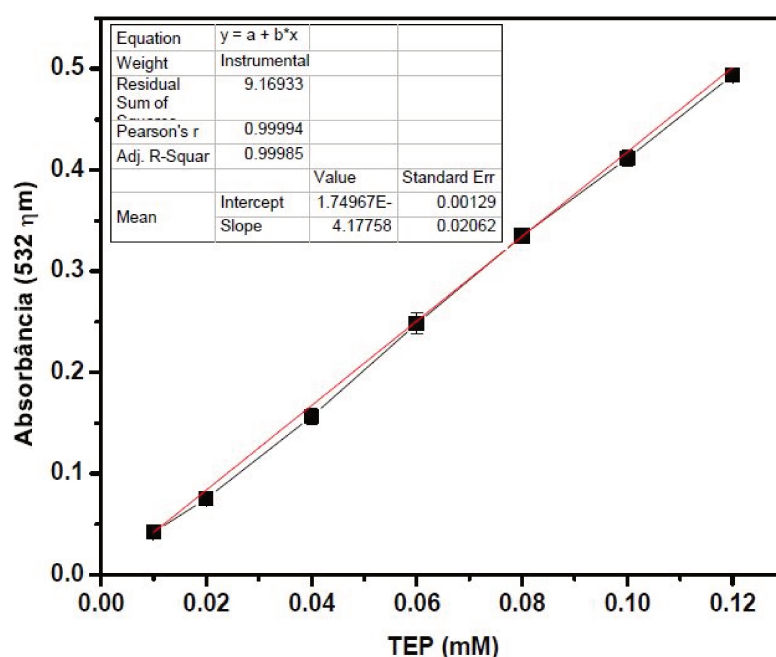


Figura 17 – Curva padrão de calibração do TEP; utilizada para a determinação da taxa de peroxidação lipídica das formulações lipossomais avaliadas com 5 mM de lipídios totais.

Tabela 4 – Percentagem de lipídios oxidados nas formulações lipossomais, em relação à concentração de lipídios totais determinado pelo teste de TBA.

Formulações	Concentração de lipídios oxidados ($10^{-6}M$),	Peróxidos (%)
Lipossoma não estéril	0,000686	0,014
L-AME encapsulado e não estéril	0,000646	0,013
Lipossoma estéril	0,061311	0,061
L-AME encapsulado e estéril	0,06136	0,061

6.1.6 Determinação da Eficiência da encapsulação

A eficiência de encapsulação (%EE) foi determinada medindo-se as concentrações de antimônio (Sb total) nas dispersões lipossomais, depois da separação do fármaco não encapsulado. Os valores foram calculados como a percentagem de antimônio (Sb) incorporado nos lipossomas através da seguinte equação:

$$\%EE = 100 \frac{A}{A+B} \quad (6.1)$$

onde *A* corresponde à quantidade de antimônio encapsulado e *B* à quantidade de antimônio não encapsulado.

Os lipossomas não estéreis apresentaram 23,3% de eficiência de encapsulação, enquanto os lipossomas estéreis mostraram 20,1% de encapsulação, evidenciando possível perda da quantidade de antimônio encapsulado durante o processo de esterilização (Tabela 5.)

Tabela 5 – Eficiência de encapsulação (%EE) das formulações lipossomais. (n=3)

<i>Formulações lipossomais</i>	<i>Média % EE</i>	<i>DP</i>
<i>L-AME não estéreis</i>	23,3	0,12
<i>L-AME estéreis</i>	20,1	0,11

Estes resultados são comparáveis com os obtidos por Frézard e col. que obtiveram %EE do antimônio de 31% em lipossomas modificados tipo FDELs (lipossomas liofilizados) compostos de L- α -distearoylfisfatidilcolina, colesterol e dicetilfosfato (5:4:1, razão molar) (FRÉZARD *et al.*, 2000).

6.2 Ensaios Biológicos

6.2.1 Curva de Proliferação dos Macrófagos DH82

Primeiramente realizou-se a curva de proliferação da linhagem de macrófagos DH82 para avaliar as fases de crescimento e determinar em qual das fases as células atingiam o ponto máximo de crescimento ideal para realizar os processos de infecção com os parasitas. Como observado na figura 18, as células não proliferaram nos três primeiros dias considerando-se como fase de adaptação dos macrófagos; a partir daí iniciou-se a fase de crescimento exponencial ou logarítmica, que se manteve até o 13º dia de crescimento. A fase estacionária de crescimento foi observada a partir do 14º dia com uma concentração de $2,05 \times 10^6$ células até o 21º $2,60 \times 10^6$ células. No 24º dia de cultivo o número de células foi reduzido para $1,48 \times 10^6$ células, provavelmente devido à escassez de nutrientes e consequente morte celular.

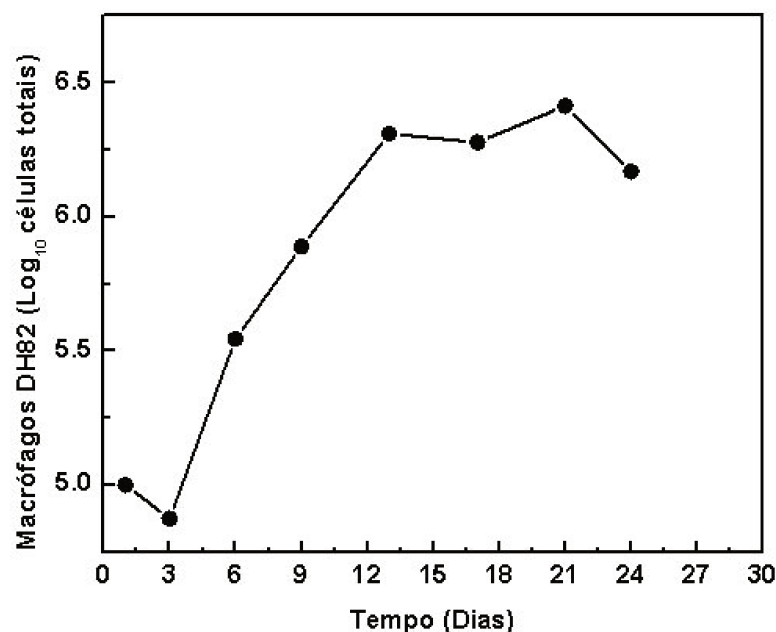


Figura 18 – Curva de proliferação celular de macrófagos DH82, aproximadamente 1×10^5 células foram cultivadas em meio de cultura DME, incubados com 5 % CO_2 , 21 % O_2 e N_2 balanceado, á 37 °C durante 25 dias. As células foram retiradas com intervalo de 3 dias dos frascos de cultivo e contadas em câmara de Neubauer.

6.2.2 Imunofluorescência dos macrófagos caninos DH82

Para confirmar que a linhagem DH82 correspondia a uma linhagem canina, realizou-se análise da expressão de CD11c, molécula de superfície da fagócitos mononucleares. Nos ensaios de imunofluorescência e análise por microscopia confocal foram obtidas as imagens apresentadas na figura 19. São células incubadas com anticorpo primário *Mouse Anti-dog CD11c*; anticorpo secundário *Alexa-488 anti-mouse* e marcador de núcleo TO-PRO-3. Pode-se confirmar que macrófagos DH82 utilizados neste trabalho foram marcados pelo anticorpo *Mouse anti-dog CD11c* de cão, confirmando que os macrófagos DH82 correspondem à uma linhagem celular canina.

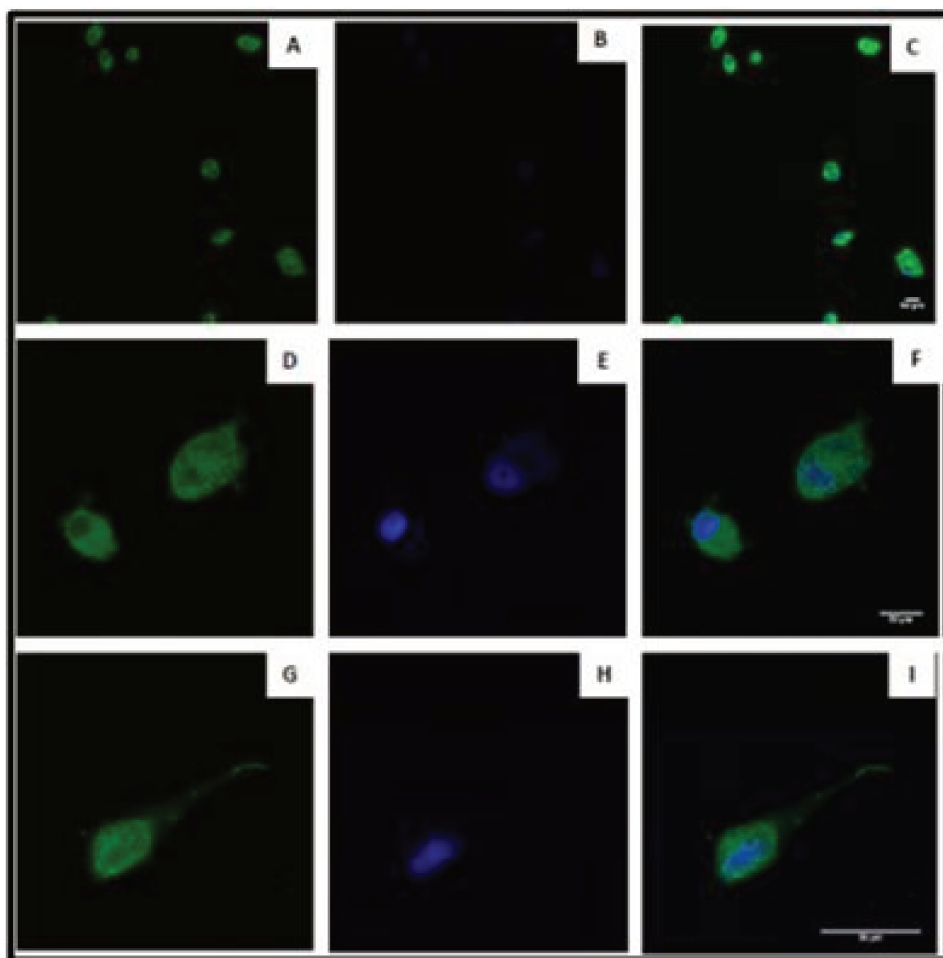


Figura 19 – Imagens de microscopia confocal: (A, D, G) macrófagos DH82 marcados com anticorpo primário *Mouse anti-dog CD11c* em canal verde; (B, E, H) macrófagos DH82 com marcador de núcleo TO-PRO-3 em canal azul; (C, F, I) macrófagos DH82 em sobreposição de canais verde (*Mouse anti-dog CD11c*) e azul (TO-PRO-3).

6.2.2.1 Análise por Citometria de fluxo dos Macrófagos DH82

Na análise realizada por citometria se confirmaram os resultados acima citados: mais do 60 % das células DH82 incubadas com os anticorpos *Mouse anti-CD11c* e *alexa 488 anti-mouse* foram marcadas. Como controle, menos de 5 % estavam marcadas, quando incubadas apenas com anticorpo primário ou anticorpo secundário (Figura (20)).

Deve-se salientar que o CD11c é um receptor de adesão da família de moléculas associadas à função de leucócitos. Este antígeno de superfície é normalmente expresso nos granulócitos, monócitos, macrófagos células NK e umas poucas populações de linfócitos T e B. O anti-CD11c, detecta um epítipo de antígeno CD11c resistente a formalina. O uso deste anticorpo é indicado, como um auxiliar na identificação e diferenciação de células tumorais. Considerando que os macrófagos DH82 e J774 são de linhagem tumoral canina e murina respectivamente, os resultados obtidos na análise de citometria de fluxo demonstram a alta

afinidade e especificidade do anticorpo Mouse Anti-dog CD11c, pelos receptores CD11c das células caninas DH82, evidenciando desta forma a veracidade da linhagem das células utilizadas.

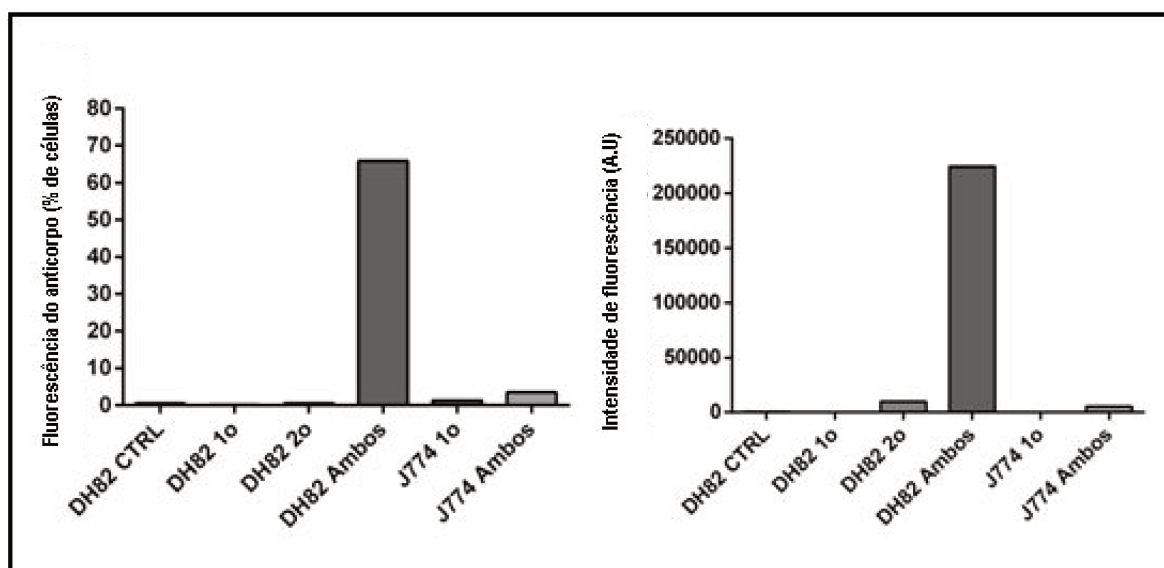


Figura 20 – Análise de citometria de fluxo das células DH82 e J774, marcadas com anticorpo primário *Mouse anti-dog CD11c*, anticorpo secundário *Alexa 488 anti-mouse*. O gráfico da esquerda mostra a percentagem de células fluorescentes e o da direita, a intensidade da fluorescência registrada.

6.2.3 Curva de Proliferação celular dos Promastigotas de *L.infantum*

Realizou-se a curva de proliferação dos promastigotas de *L.infantum*, com o intuito de saber a fase de crescimento na qual o parasita tinha o crescimento adequado para realizar o processo de infecção. Na figura 21 observa-se que o número de promastigotas aumenta exponencialmente a partir de 24 h de cultivo, atingindo seu pico de proliferação (fase logarítmica) em 120 h $2,0 \times 10^8$ parasitas/mL; posteriormente os promastigotas entram em fase estacionária de proliferação (144 h). Após 144 horas de incubação observa-se que o número de parasitas é reduzido gradativamente, até às 192 h de crescimento (com 1×10^8 parasitas/mL).

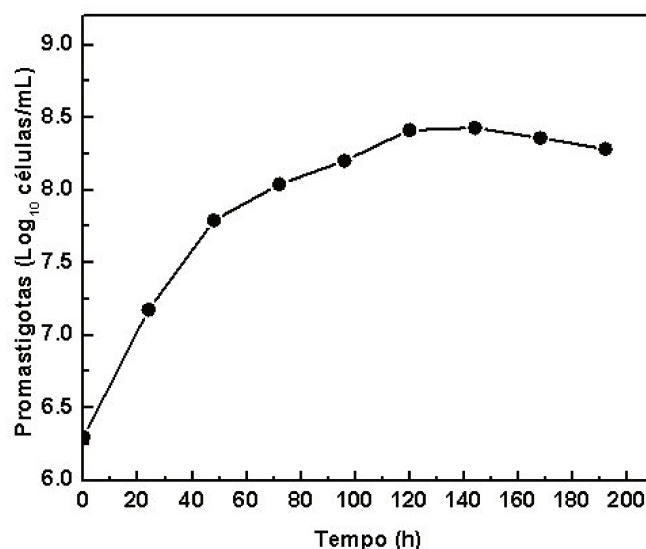


Figura 21 – Curva de proliferação celular de promastigotas de *L.infantum*, cerca de $\log(10) 2,0 \times 10^6$ promastigotas/mL foram cultivados em meio Schneider, e mantidos em estufa a 26 °C. Os parasitas foram retirados diariamente dos frascos de cultivo e contados em câmara de Neubauer

6.2.4 Padronização do ensaio de Infecção dos Macrófagos DH82 com *L.infantum*

Nos ensaios de infecção de macrófagos foram inicialmente testadas as duas formas do parasita (promastigota e amastigota) e três razões parasita:célula, 5:1, 10:1, 20:1, com o intuito de estabelecer qual das duas formas do parasita e porcentagem parasita célula apresentava a melhor taxa de infecção para realizar os ensaios com o fármaco AME livre e as formulações lipossomais.

Quando os macrófagos foram infectados com promastigotas a porcentagem de células infectadas foi de 29,0 e 47,6 % (proporções 5:1 e 20:1, respectivamente), como mostra a figura 22 A. A infecção dos macrófagos com amastigotas resultou em porcentagem de infecção 67,7 e 90,9 % (proporções 5:1 e 20:1, respectivamente) (Figura 23 B).

A elevada taxa de infecção nos macrófagos infectados registrada na infecção com amastigotas dificultou a contagem, pois as células tinham um número muito alto de parasitas intracelulares (aproximadamente 13 amastigotas por célula na proporção de infecção 20:1. (Figura 22 (D) e figura 23).

Os resultados indicam que as duas formas do parasita são infectantes para as células caninas mas os promastigotas são mais adequados para o ensaio, pois ao infectar células DH82, não induzem a superinfecção dos macrófagos.

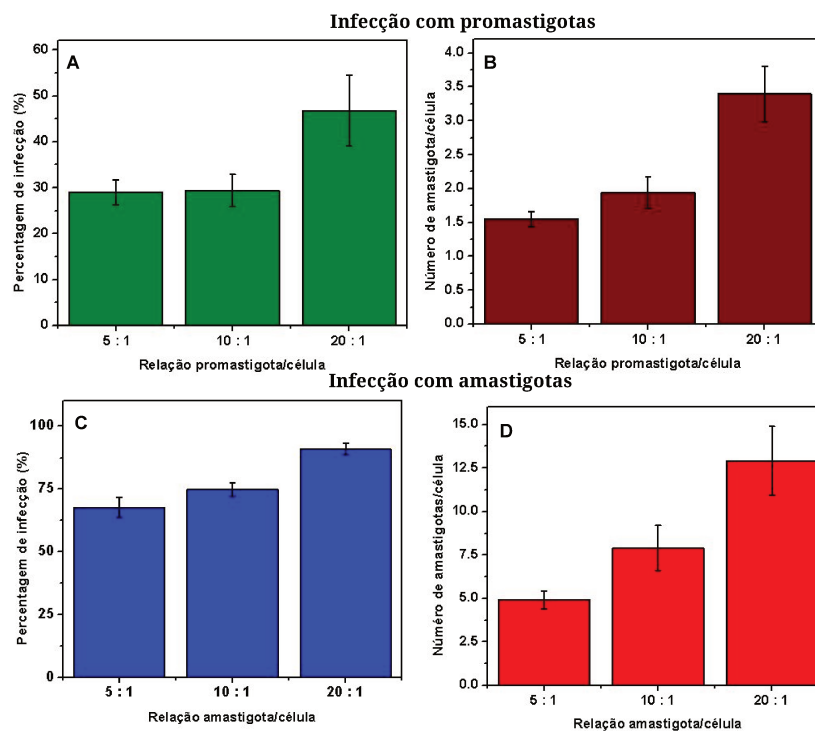


Figura 22 – Percentagem de infecção de macrófagos DH82 com promastigotas (A) e amastigotas (B) de *L. infantum*, nas proporções 5:1, 10:1, 20:1 parasita: célula. Número de amastigotas por célula, células infectadas com promastigotas (C) e amastigotas (D).

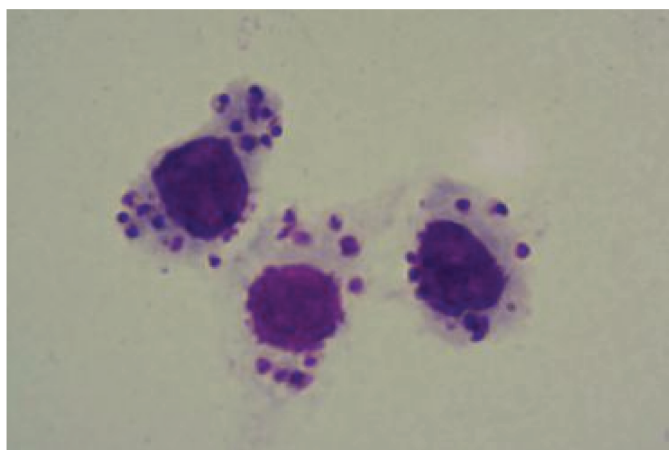


Figura 23 – Micrografia da célula DH82 com a forma intracelular amastigota do parasita *L. infantum*, na proporção 20:1. Colorada com Giemsa. aumento de 100X.

Considerando-se esses resultados os próximos experimentos de infecção foram feitos com a proporção parasita:célula de 20:1, utilizando-se a forma promastigota de *L. infantum*.

6.2.5 Ensaios de Toxicidade e Viabilidade Celular

6.2.5.1 Toxicidade do AME em promastigotas de *L. Infantum*

Inicialmente foi testado o efeito do fármaco AME, em promastigotas de *L. infantum*. Pode-se observar na figura 24 que embora nenhuma das concentrações de AME atingisse a eliminação total dos promastigotas, foi evidente a diminuição do seu número. O efeito do AME na proliferação dos parasitas ocorreu após 48 horas de tratamento e se manteve até as 96 h, apresentando um comportamento tempo dependente.

Há relação direta entre a toxicidade nas culturas de promastigotas de *L. infantum* e as concentrações de AME testadas. A concentração 0,2 M causou 50 % de inibição do crescimento dos promastigotas, após 48 e 96 h, enquanto a concentração 0,4 M atingiu valores de 66 e 96 % de inibição dos promastigotas, as 48 e 96 h mostrando um comportamento dose dependente. O valor encontrado foi compatível com o descrito na literatura por Borborema e col., que encontraram IC_{50} de 0,2 M para AME em promastigotas de *L. major* e Tempone e col., determinaram IC_{50} de 0,1 M para AME em promastigotas de *L. chagasi* (BORBOREMA *et al.*, 2011; TEMPONE *et al.*, 2004).

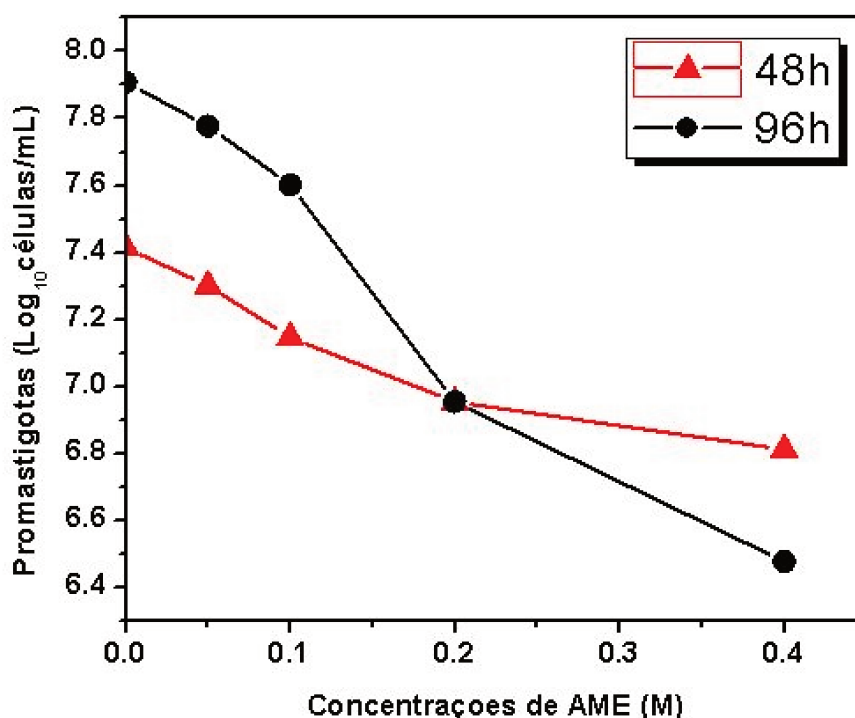


Figura 24 – Logaritmo do número de promastigotas de *L. infantum* por mL após tratamento com diferentes concentrações de AME, durante 48 e 96 h. Células cultivadas em meio Schneider a 26 °C, contadas em câmara de Neubauer.

A baixa atividade antiparasitária do antimônio pentavalente sobre as formas promastigotas pode ser explicada pela necessidade de conversão do antimônio pentavalente, em sua forma trivalente, mais tóxica e cuja transformação parece ser dependente de enzimas do

sistema de proteção contra danos oxidativos e a tripanotiona, um tiol de baixa massa molecular (formado por 2 duas moléculas de glutatona ligadas por uma poliamina), presente em quantidades muito maiores na forma intracelular (amastigota) do parasita. Estas enzimas vêm sendo descritas como fundamentais no processo de bioconversão do antimônio pentavalente para a forma trivalente. As propriedades antileishmania dos fármacos antimoniais provavelmente seriam decorrentes da associação do complexo entre o Sb^{3+} -tripanotiona, com enzimas (YAN *et al.*, 2003).

Apesar dos estudos reportados na literatura, o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes no tratamento das Leishmanioses ainda permanece pouco compreendido. Até o momento não está bem esclarecido se a forma ativa final dos agentes antimoniais pentavalentes é o Sb^{5+} ou o Sb^{3+} (FRÉZARD *et al.*, 2009).

A baixa atividade do antimônio pentavalente nas formas promastigotas foi mostrada por Roberts e col., que verificaram que frações do estibogluconato de sódio foram mais eficientes contra formas amastigotas de *L.panamensis* do que contra formas promastigotas (ROBERTS; RAINEY, 1993).

Quando promastigotas de *L.donovani* foram pré-tratadas com tartarato de antimônio e potássio e depois incubadas com estibogluconato de sódio, o Sb^{5+} reverteu a toxicidade do Sb^{3+} , sendo o Sb^{5+} pouco eficiente contra a forma promastigota de *Leishmania* sp (SHAKED-MISHAN *et al.*, 2000). Os autores ainda concluíram que ambas formas, promastigotas e amastigotas, acumulam antimônio pentavalente.

A redução do Sb^{5+} para Sb^{3+} , por processos enzimáticos ou não, ocorre em ambas as formas do parasita, porém a atividade redutora é mais intensa em amastigotas. Esses dados são consistentes com a hipótese de redução, dentro da célula hospedeira, do Sb^{5+} em sua forma trivalente ativa.

6.2.5.2 Citotoxicidade do AME e do AME lipossomal (L-AME) em Macrófagos DH82

Os efeitos citotóxicos de diferentes concentrações de AME e L-AME foram determinados em macrófagos DH82 avaliando a viabilidade celular (% de células viáveis), a través do método de exclusão do azul de tripan, e pelo método de redução do MTT.

Na figura 25, se observa as percentagens de células viáveis quando tratados com soluções com diferentes concentrações de AME e L-AME, respectivamente, comparando-se aos controles não tratados. Considerando as análises realizadas pelos dois métodos de avaliação, observa-se que o AME na sua forma não encapsulada foi mais tóxico para a linhagem DH82, em comparação com o AME lipossomal (L-AME). A diminuição do 50 % da viabilidade celular dos macrófagos tratados com AME não encapsulado foi encontrado nas concentrações 0,05 (48 h) e 0,01 M (96 h) quando comparado com o controle não tratado. A diferença das células tratadas com as formulações de AME lipossomal, as quais atingiram valores próximos ao 50

% da viabilidade celular só na máxima concentração testada (0,01 M) nas 48 h de tratamento, observando-se uma recuperação das células nas 96 h de tratamento aumentando sua viabilidade celular acima ao 70 %. Os resultados observados mostram que o antimoniato de meglumina lipossomal apresentou baixa toxicidade para macrófagos DH82.

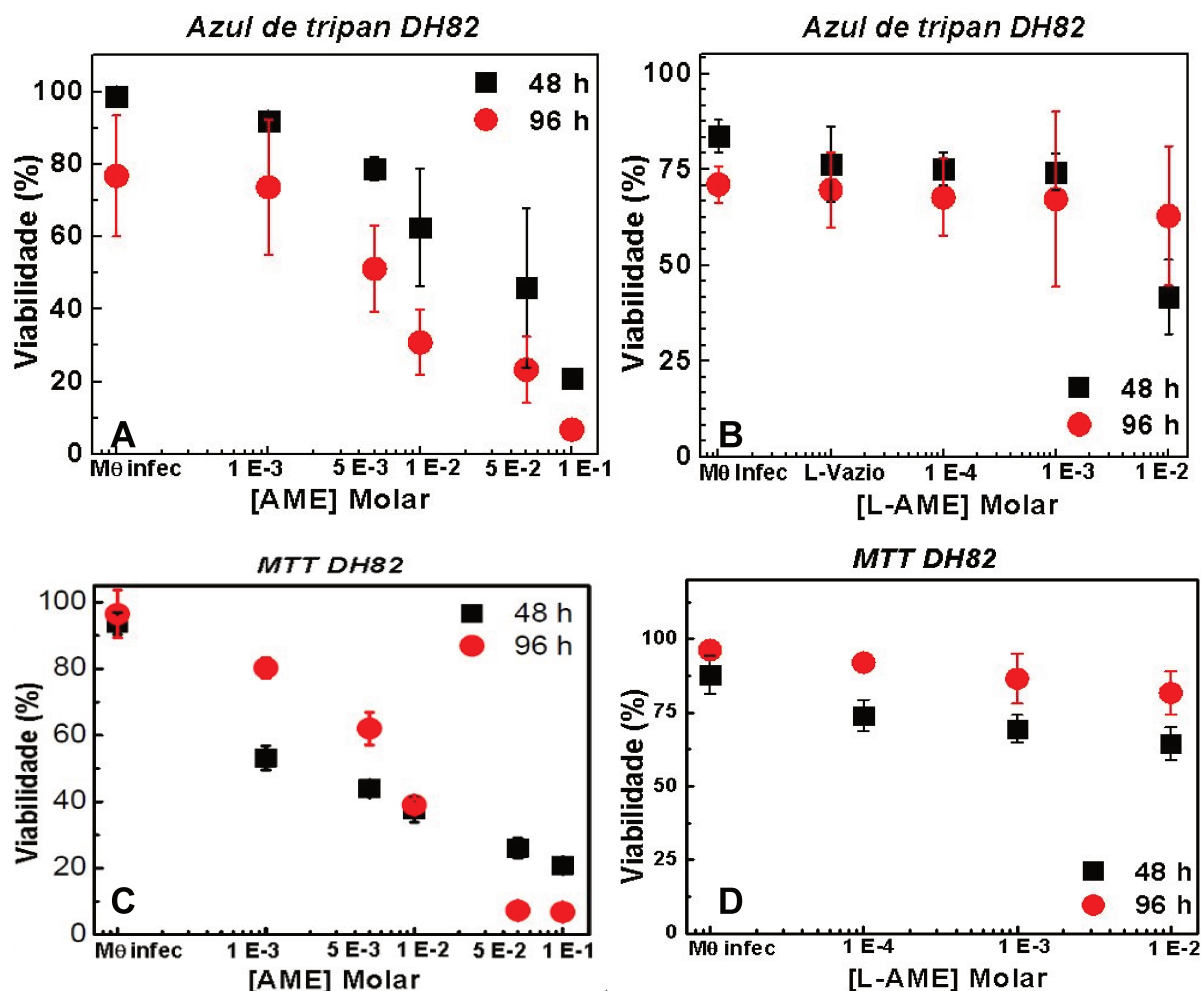


Figura 25 – Viabilidade celular de macrófagos DH82 não infectados e tratados com diferentes concentrações de AME e L-AME, durante 48 e 96 h. Células cultivadas em meio DME a 37°C. Imagens correspondentes à: técnica de exclusão por azul de tripan; tratado com AME (A), tratado com L-AME (B); técnica de redução do MTT: com AME (C), com L-AME (D).

O efeito tóxico apresentado pelo AME nos macrófagos podem se explicar mediante a interação das enzimas antioxidantes do hospedeiro como as do sistema glutathiona, principal tiol encontrado no citossol de células de mamíferos, que também contribuem com o processo de bioconversão do antimônio pentavalente ao trivalente, porém de forma menos intensa, em comparação com as enzimas que realizam a bioconversão na *Leishmania* sp (YAN *et al.*, 2003). Com a presença do sistema lipossomal L-AME os efeitos de toxicidade apresentados pelo AME na sua forma livre são diminuídos o que mostra a vantagem de usar o sistema lipossomal ao diminuir os danos causados nos macrófagos, célula hospedeira da *L. infantum*.

6.2.5.3 Atividade Antileishmania do AME e do L-AME em macrófagos DH82 infectados com *L. infantum*

A atividade antileishmania do AME e da formulação lipossomal L-AME, em diferentes concentrações, foi avaliada em macrófagos DH82 infectados com *L. infantum*.

O tratamento com AME encapsulado resultou em uma diminuição da percentagem de células infectadas (figura 26 B), em todas as concentrações testadas de antimoniato de meglumina encapsulado ($\leq 50\%$). O tratamento com os lipossomas sem AME encapsulado (controle), representado no gráfico como M0 infec) também causou diminuição na percentagem de células infectadas (redução de 10% com relação ao controle) e na maior concentração utilizada (0,01 M) os macrófagos apresentaram uma percentagem de infecção de 33% nos tempos de 48 e 96 h; em comparação ao efeito apresentado pelo antimoniato de meglumina não encapsulado (figura 26 B), que não induziu diminuição do 50% da infecção dos macrófagos em nenhum dos tempos de análise sendo que a menor taxa de infecção percentual (65%) na concentração 0,01 M, foi observada após 48 horas de análise.

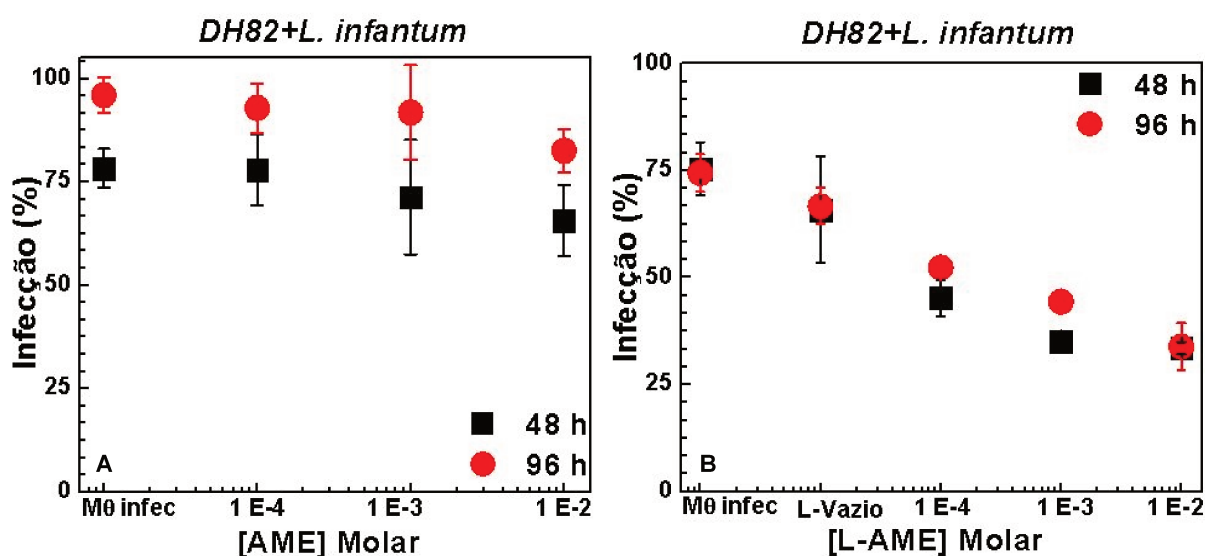


Figura 26 – Percentagem de infecção de macrófagos DH82 infectados com *L. infantum* e tratados com: AME livre (A), AME lipossomal (L-AME) (B), após 48 e 96 h.

Da mesma forma o número de amastigotas no tratamento com AME não encapsulado, diminuiu, em relação ao controle, nas três concentrações utilizadas (0,0001, 0,001 e 0,01 M) porém menos do que o efeito observado com L-AME.

Na figura 27, observa-se o aspecto morfológico de macrófagos DH82 não infectados e não tratados, os quais apresentam forma oval e núcleo localizado excêntricamente. (Figura 27 A). Os macrófagos não infectados mas que foram tratados com AME apresentaram morfologia alterada, evidenciando-se alongamento anormal do citoplasma, descentralização do núcleo, e diminuição da quantidade de células por campo, podendo-se inferir que o fármaco na sua forma livre ocasionou efeitos tóxicos nas células, gerando estresse nas mesmas, efeito que se observou

diminuído nos macrófagos que foram tratados com o fármaco na formulação lipossomal (L-AME), onde se observou uma forma mais esférica do citoplasma sem deslocalização do núcleo, podendo-se observar uma diminuição dos efeitos tóxicos causado pelo fármaco (AME), podendo ser atribuído à proteção do sistema lipossomal nas células.

Macrófagos infectados também são ovais com núcleo excêntrico. Os macrófagos infectados e sem tratamento apresentaram muitos amastigotas intracelulares (Figura 27 D), enquanto que os macrófagos infectados e tratados com o AME na sua forma livre (0,001 M) apresentaram uma diminuição considerável dos amastigotas intracelulares efeito que se vê incrementado pelo tratamento lipossomal na mesma concentração de fármaco onde foi encontrado em média 1 amastigota por célula (Figura 27 E-F).

Dessa forma as formulações lipossomais com AME mostraram um efeito maior quanto à manutenção da viabilidade celular em macrófagos não infectados e infectados, e na diminuição da carga parasitária em macrófagos infectados em comparação aos resultados obtidos com o tratamento de macrófagos tratados com AME não encapsulado (Figura 28).

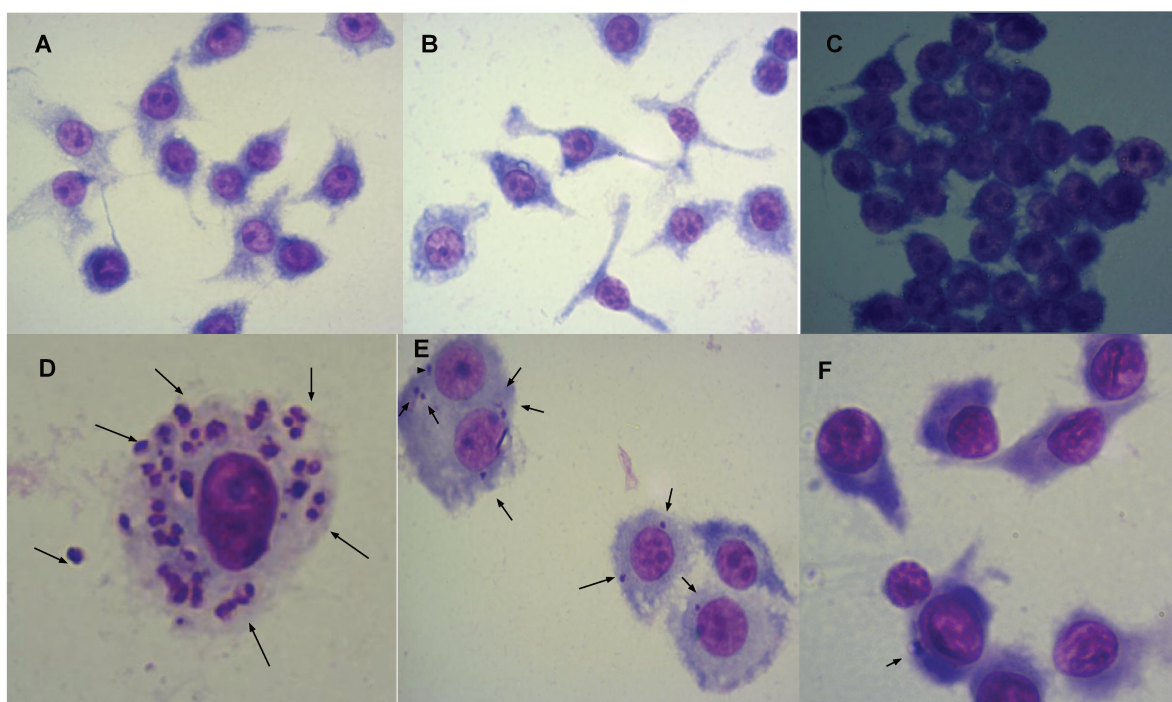


Figura 27 – Micrografias de macrófagos DH82, corados com Giemsa (100x). Faixa superior, macrófagos não infectados após 96 h de tratamento: (A) sem tratamento, (B) tratados com AME, (C) tratados com L-AME. Faixa inferior, macrófagos infectados com promastigotas de *L.infantum*, após 96 h de infecção: (D) sem tratamento, (E) após tratamento com AME 0,01M, (F) após tratamento com L-AME 0,01M. As setas indicam a presença de amastigotas.

Também foi analisada a viabilidade dos macrófagos quando infectados e tratados quanto com AME e L-AME (Figura 28). Um aumento da viabilidade celular nas culturas

tratadas com AME lipossomal (L-AME) foi observado quando comparado com a viabilidade de macrófagos infectados e tratados com AME.

O tratamento com L-AME induziu uma diminuição de apenas 10% da população de macrófagos infectados por 96 horas (0,01 M), em comparação com o controle de macrófagos infectados sem tratamento, evidenciando-se um comportamento de manutenção celular propiciado possivelmente pelo efeito de proteção oferecido pelo sistema lipossomal.

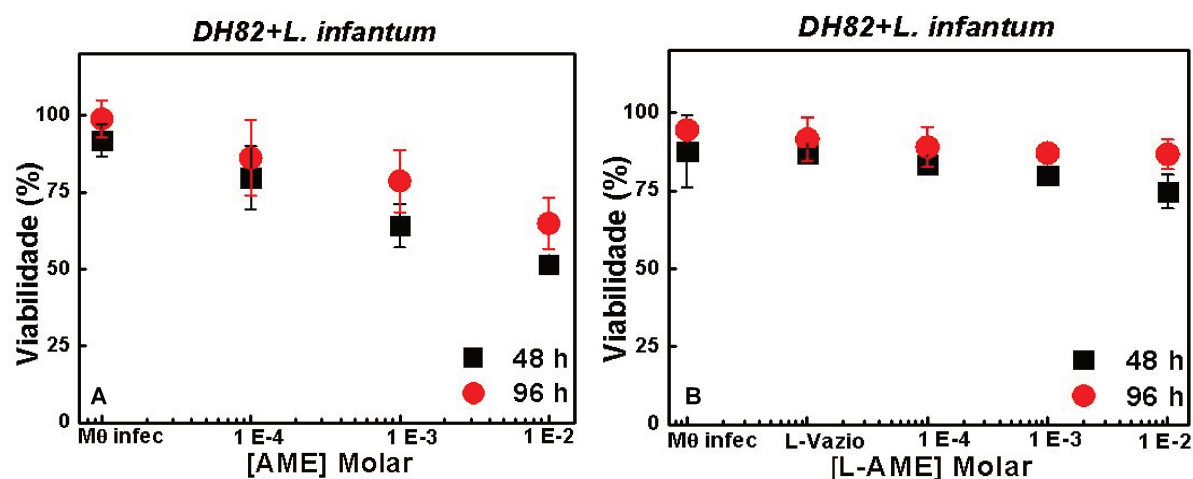


Figura 28 – Percentagem da viabilidade celular de macrófagos DH82 infectados com *L.infantum* após 48 e 96 h.(A) macrófagos tratados com AME; (B) macrófagos tratados com L-AME

Os resultados obtidos e apresentados para os sistema lipossomal com antimoniato de meglumina (L-AME), evidenciaram melhorias tanto em termos de viabilidade celular, diminuição da carga parasitária, estabilidade física e química da formulação preparada, quando comparamos esses parâmetros com o fármaco AME não encapsulado.

É importante ressaltar que não foi observado efeito algum de agregação ou precipitação da suspensão lipossomal durante os testes, de cultura *In vitro*. Assim a formulação apresentou estabilidade física, importante para a solubilidade no meio de cultura, durante os dias da análise.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser explicados pela alta afinidade das vesículas lipossomais aniônicas pelas células já que a carga da membrana dos lipossomas é uma característica essencial para a interação célula-liposoma. Além disso, os lipossomas carregados negativamente têm mostrado maior estabilidade em sistemas biológicos, quando comparado com formulações com carga positiva, como consequência de uma diminuída adesão das proteínas do soro á superfície dos lipossomas (OKU *et al.*, 1996). Tempone e col. demonstraram em estudos *in vitro* que a carga apresentada na membrana externa dos lipossomas contribui para uma alta interação dos lipossomas com receptores *scavenger* (SavR) dos macrófagos (TEMPONE *et al.*, 2004). De acordo com Fadok e col. os receptores (SavR) são

os principais sítios para a ligação de lipossomas aniônicos, como consequência da depuração apoptótica regular de células senescentes por macrófagos (FADOK *et al.*, 2000). Tem relatos da presença e alta expressão destes receptores nas membranas celulares de macrófagos infectados com *Leishmania* (TEMPONE *et al.*, 2004). Este fato pode também ter contribuído para a eficácia superior das formulações lipossomais com carga negativa. Estes resultados demonstram ainda que os lipossomas são capazes de direcionar fármacos para macrófagos e entregá-los nos fagolisossomas. Os lipossomas com carga negativa podem ter como alvo os vacúolos parasitóforos dentro de macrófagos por um mecanismo relacionado com anexinas, proteínas hidrofílicas que se ligam de maneira reversível aos fosfolipídios carregadas negativamente e atuam como moléculas de ponte na fusão das vesículas (TEMPONE *et al.*, 2004). Dentro deste compartimento, os lipossomas são interrompidos por um fosfolipase de fase ácida e sofrem degradação fagolisossômica, na última fase, liberando assim o seu conteúdo para o citoplasma (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009; AHSAN *et al.*, 2002). Lipossomas carregados são conhecidos por serem fagocitados em maior taxas, devido a interações específicas ou electrostáticas entre as células e vesículas. Com efeito, a inclusão de PS pode levar ao preferida reconhecimento de lipossomas pelas células mononucleares do sistema fagocítico (SCHWENDENER *et al.*, 1984).

6.2.6 Estudos de colocalização intracelular lipossoma-parasita.

A colocalização intracelular dos lipossomas LUV marcados com NDB-PE e dos lipossomas *L. infantum* com a proteína fluorescente *m-cherry* foi avaliada por microscopia confocal realizando análise de processamento de imagens com o programa ImageJ, durante 2,4,6 e 8 h como mostrado na figura 29, onde se observa um comportamento tempo dependente no aumento do número de colocalizações parasita-célula, começando com aproximadamente 500 colocalizações as 2 h até atingir ao redor de 3000 colocalizações nas 8 h de tratamento. Este comportamento pode ser observado qualitativamente nas micrografias mostradas na figura 30 onde se observam os sinais do marcador de núcleo DRAQ5 (canal azul), parasita *L. infantum* *m-cherry*, lipossomas com NDB-PE (canal verde), o sinal de colocalização do núcleo, parasito e lipossoma evidencia-se pela emissão no canal amarelo, cuja intensidade aumenta em relação ao aumento do tempo de tratamento. O maior número de colocalizações se observam nas 8 h de tratamento como pode ser observado na figura 31 onde a colocalização pode se determinar pela emissão no canal amarelo.

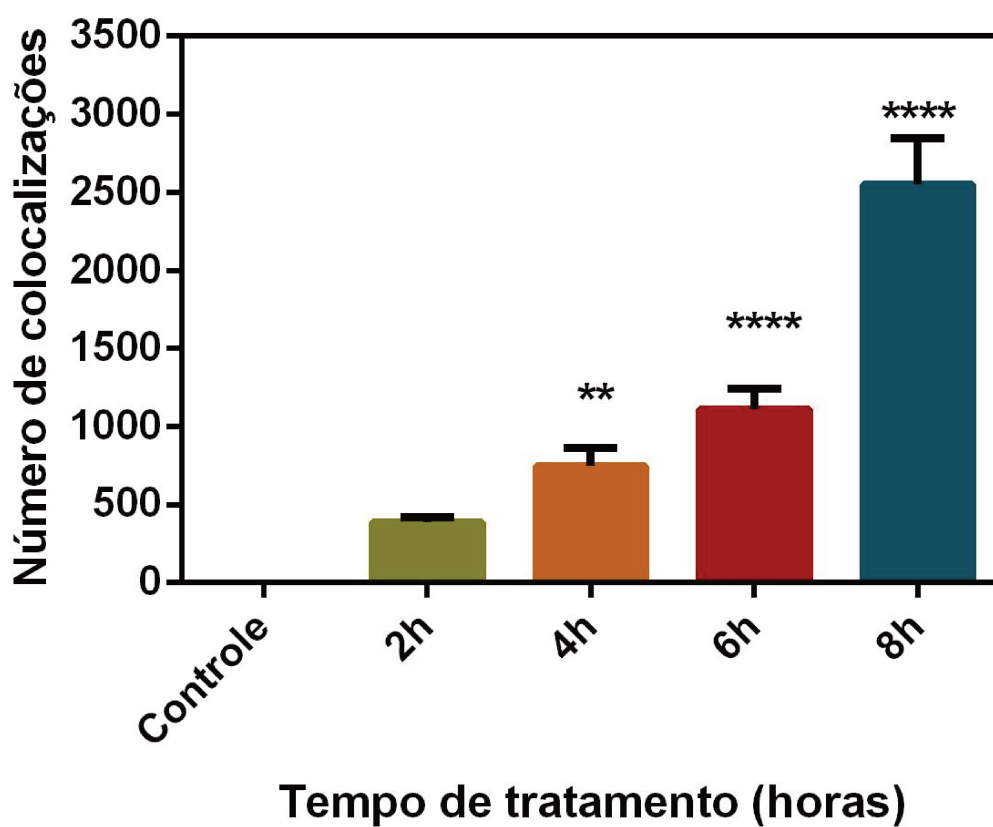


Figura 29 – Número de colocalizações intracelulares em macrófagos DH82 do parasito *L. infantum* e dos lipossomas LUV com NDB-PE após 2,4,6 e 8h de tratamento. Análise realizado por tratamento de imagens obtidas por microscopia confocal com o programa ImageJ.

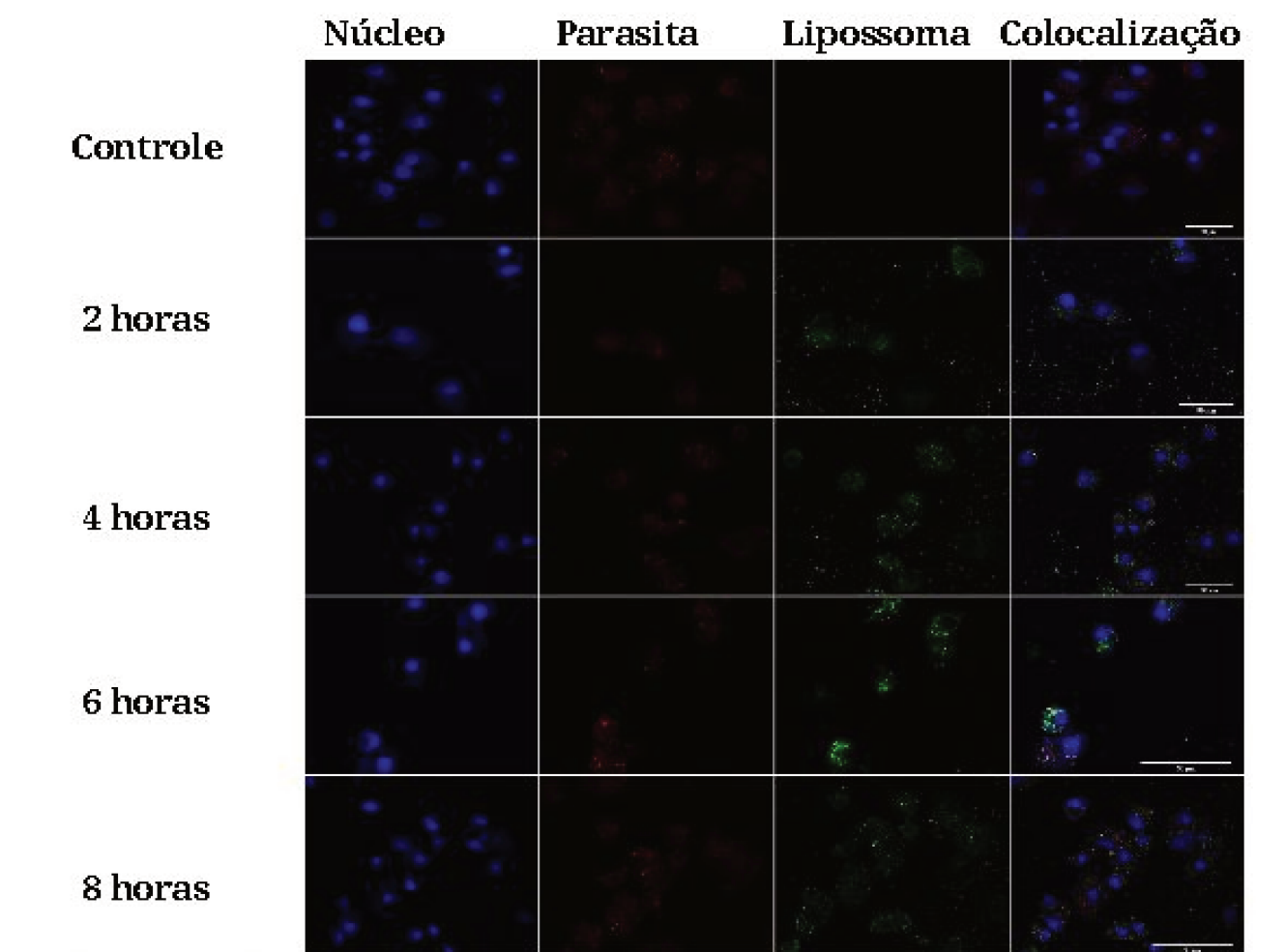


Figura 30 – Número de colocalizações intracelulares em macrófagos DH82 com marcador de núcleo DRAQ5 (canal azul) do parasito *L. infantum-mcherry* (canal vermelho) e dos lipossomas LUV com NDB-PE (canal verde) após 2,4,6 e 8h de tratamento. Análise realizado por tratamento de imagens obtidas por microscopia confocal com o programa ImageJ.

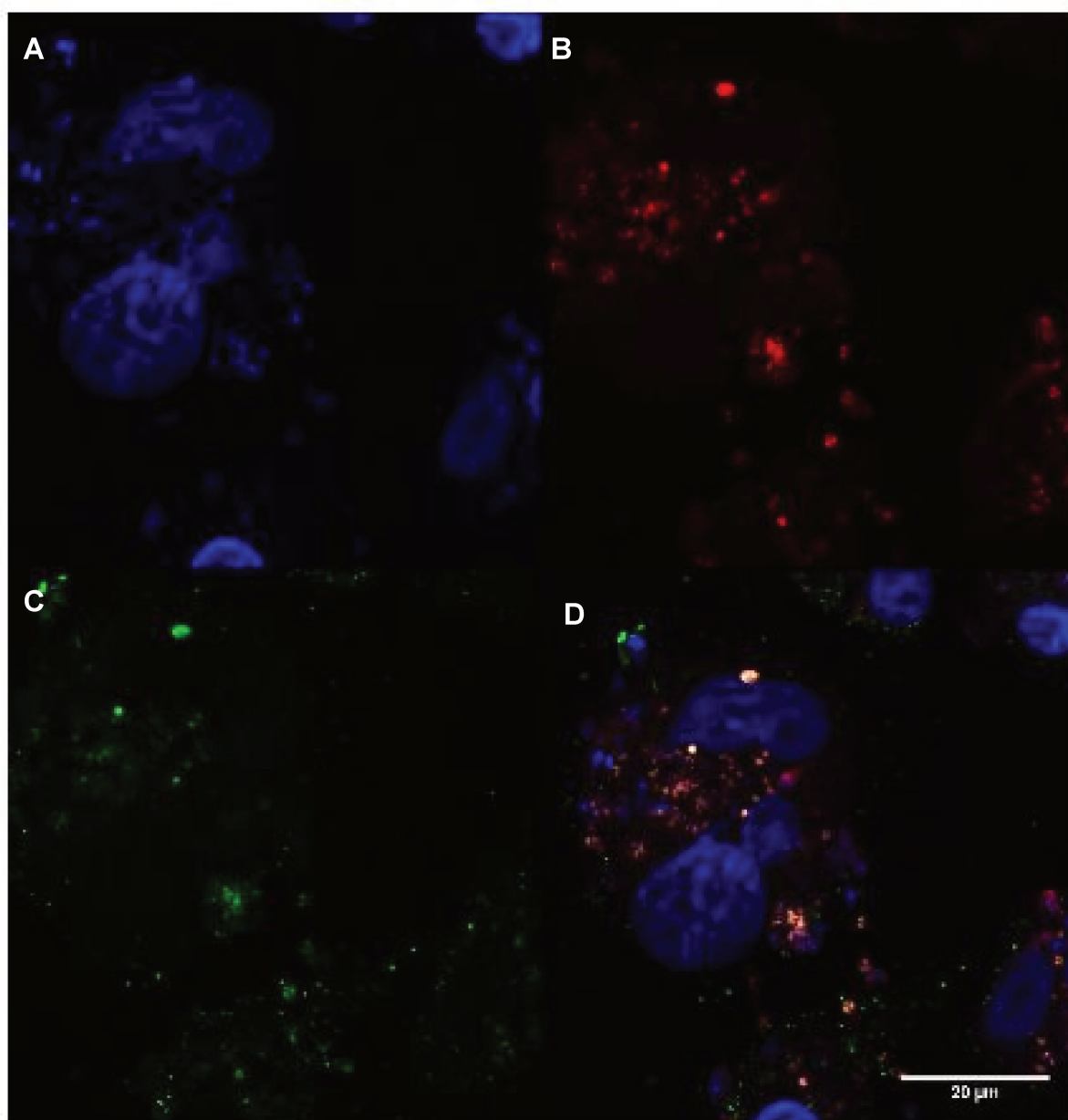


Figura 31 – Número de colocalizações intracelulares em macrófagos DH82 do parasito *L. infantum* e dos lipossomas LUV com NDB-PE após 8h de tratamento. (A) Marcação do núcleo dos macrófagos DH82 com DRAQ5 observado no canal azul. (B) Macrófagos DH82 infectados com parasitos *L. infantum-mcherry* observados no canal vermelho. (C) Macrófagos DH82 com lipossomas LUV marcados com NDB-PE observados no canal verde. (D) Colocalização dos lipossomas marcados com NDB-PE e os parasitos *L. infantum-mcherry* dentro dos macrófagos DH82 observada pela emissão no canal amarelo. Análise realizado por tratamento de imagens obtidas por microscopia confocal com o programa ImageJ.

7 CONCLUSÕES

Uma formulação para liberação sustentada do fármaco antileishmania, antimoniato de meglumina, encapsulado em lipossomas de 400 nm e compostos de EPC, CHOL, PS e α -tocoferol, foi preparada, caracterizada físico-quimicamente e avaliada *in vitro*, quanto à seu efeito leishmanicida, em macrófagos de cão infectados com *L. infantum*.

Testes de estabilidade química não indicaram um aumento significativo nos níveis de endoperóxidos na formulação lipossomal. Mesmo nos lipossomas que foram submetidos ao processo de esterilização por calor, para serem usados nos testes de avaliação biológica, os níveis de peróxido não ultrapassaram 1 % da concentração total de lipídios presentes na formulação.

A porcentagem de encapsulação do AME neste sistema lipossomal, se manteve próxima a 20 % nos lipossomas estéreis e não estéreis.

Análises de espalhamento dinâmico de luz indicaram que as vesículas não estéreis permaneceram estáveis quanto ao tamanho dos lipossomas, PDI e potencial Zeta, por até 180 dias de armazenamento. Nos lipossomas esterilizados por calor houve aumento do diâmetro médio das partículas, que ultrapassaram 400 nm após 6 meses a 4 °C.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, em cultura de macrófagos DH82, demonstraram que o sistema lipossomal (L-AME), foi menos citotóxico em comparação com AME livre, indicando que a formulação pode ser adequada para futuros ensaios *in vivo* em cães.

A avaliação dos efeitos *in vitro* (testes em cultura de macrófagos infectados com *L. infantum*) da formulação lipossomal, mostrou que o sistema induz diminuição mais acentuada da carga parasitária, nos macrófagos infectados que aquela induzida pelo AME livre.

Neste sentido, os resultados aqui apresentados e discutidos, são de grande importância na investigação, pesquisa, caracterização e aplicação de formas farmacêuticas de liberação sustentada para o fármaco leishmanicida antimoniato de meglumina. Eles indicam perspectivas que a encapsulação em lipossomas pode melhorar a eficácia do AME, sendo viável sua avaliação e aplicação em cães, levando à uma formulação eficaz para uso clínico do antimoniato de meglumina.

Lipossomas marcados com NDB-PE foram internalizados nos macrófagos DH82 e colocalizados intracelularmente com os parasitos *L. infantum*- *m-cherry*, encontrando-se acima de 3000 colocalizações às 8 h de tratamento lipossomal, indicando que possivelmente a eficácia *in vitro* do sistema é devido à presença do parasito e do sistema lipossomal no mesmo local de ação.

Referências

AHSAN, F.; RIVAS, I. P.; KHAN, M. A.; Torres Suárez, A. I. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers–liposomes and microspheres–on the phagocytosis by macrophages. *Journal of Controlled Release*, v. 79, n. 1, p. 29–40, 2002. ISSN 01683659. Citado na página 72.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews*, v. 65, n. 1, p. 36–48, jan 2013. ISSN 1872-8294. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12002980>>. Citado 2 vezes nas páginas 17 and 30.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. *Advances in Parasitology Volume 57*. Elsevier, 2004. v. 57. 1–88 p. (Advances in Parasitology, v. 57). ISSN 0065-308X. ISBN 9780120317578. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504537>>. Citado 3 vezes nas páginas 22, 26, and 28.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. de. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012. ISSN 19326203. Citado na página 16.

ALVING, C. R.; STECK, E. A.; CHAPMAN, W. L.; WAITS, V. B.; HENDRICKS, L. D.; SWARTZ, G. M.; HANSON, W. L. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 75, n. 6, p. 2959–63, jun 1978. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=392686&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 31.

ALVING, C. R.; STECK, E. A.; CHAPMAN, W. L.; WAITS, V. B.; HENDRICKS, L. D.; SWARTZ, G. M.; HANSON, W. L. Liposomes in leishmaniasis: Therapeutic effects of antimonial drugs, 8-aminoquinolines, and tetracycline. *Life Sciences*, v. 26, n. 26, p. 2231–2238, jun 1980. ISSN 00243205. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0024320580902076>>. Citado 2 vezes nas páginas 31 and 32.

ALVING, C. R.; STECK, E. A.; CHAPMAN, W. L.; WAITSS, B.; HENDRICKST, L. D.; SWARTZ, G. M.; HANSON, L. No Title. v. 26, p. 2231–2238, 1980. Citado na página 33.

AMATO, V. S.; RABELLO, A.; ROTONDO-SILVA, A.; KONO, A.; MALDONADO, T. P. H.; ALVES, I. C.; FLOETER-WINTER, L. M.; NETO, V. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. *Acta tropica*, v. 92, n. 2, p. 127–32, oct 2004. ISSN 0001-706X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350864>>. Citado na página 32.

ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates–A review. *Journal of Controlled Release*, v. 128, n. 3, p. 185–199, 2008. ISSN 01683659. Citado na página 16.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. *Journal of medical microbiology*, v. 56, n. Pt 2, p. 143–53, feb 2007. ISSN 0022-2615. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244793>>. Citado na página 26.

BAKKER-WOUDENBERG, I. A. Delivery of antimicrobials to infected tissue macrophages. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Elsevier, v. 17, n. 1, p. 5–20, oct 1995. ISSN 0169409X. Disponível em: <<http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/delivery-of-antimicrobials-to-infected-tissue-macrophages-sp6dAq7SN2>>. Citado na página 31.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, v. 175, n. 1, p. 14–5, jan 2008. ISSN 1090-0233. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215150>>. Citado 3 vezes nas páginas 16, 22, and 27.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, v. 106, n. 4, p. 315–24, jul 2002. ISSN 0304-4017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12079737>>. Citado na página 27.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite immunology*, v. 28, n. 7, p. 329–37, jul 2006. ISSN 0141-9838. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842269>>. Citado na página 22.

BASU, M. K.; LALA, S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. *Current molecular medicine*, v. 4, n. 6, p. 681–9, sep 2004. ISSN 1566-5240. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357216>>. Citado na página 26.

BAWARSKI, W. E.; CHIDLOWSKY, E.; BHARALI, D. J.; MOUSA, S. A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 4, n. 4, p. 273–282, 2008. ISSN 15499634. Citado 2 vezes nas páginas 28 and 29.

BERMAN, J. ABLE: A New and Improved Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg*, v. 80, n. 5, p. 689–690, may 2009. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/80/5/689.full>>. Citado 2 vezes nas páginas 26 and 27.

BERMAN, J. D.; HANSON, W. L.; CHAPMAN, W. L.; ALVING, C. R. Antileishmanial Activity of Liposome-Encapsulated Amphotericin B in Hamsters and Monkeys. v. 30, n. 6, p. 847–851, 1986. Citado 2 vezes nas páginas 25 and 26.

BODHE, P. V.; KOTWANI, R. N.; KIRODIAN, B. G.; PATHARE, A. V.; PANDEY, A. K.; THAKUR, C. P.; KSHIRSAGAR, N. A. Dose-ranging studies on liposomal amphotericin B (L-AMP-LRC-1) in the treatment of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 3, p. 314–8, jan 1999. ISSN 0035-9203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10492769>>. Citado na página 32.

BOER, M. den; ARGAW, D.; JANNIN, J.; ALVAR, J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clinical Microbiology and Infection*, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v. 17, n. 10, p. 1471–1477, 2011. ISSN 1198743X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03635.x>>. Citado na página 16.

BORBOREMA, S. E. T.; SCHWENDENER, R. A.; OSSO, J. A.; ANDRADE, H. F. de; NASCIMENTO, N. do. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania* (*Leishmania*) major-infected macrophages. *International journal of antimicrobial agents*, v. 38, n. 4, p. 341–7, oct 2011. ISSN 1872-7913. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092485791100255X>>. Citado 4 vezes nas páginas 33, 34, 66, and 101.

BRASIL, M. de salud del. *Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en Las Américas*. [S.l.: s.n.], 2005. 150 p. ISBN 0000000000. Citado 2 vezes nas páginas 24 and 28.

BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; KONING, H. P. de. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*, Elsevier, v. 19, n. 5, p. 232–239, may 2003. ISSN 14714922. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1471492203000692/fulltext>>. Citado 2 vezes nas páginas 26 and 31.

BRITO, M. A.; SILVA, R. M.; MATOS, D. C.; SILVA, A. T. da; BRITES, D. T. Alterations of erythrocyte morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia. *Clinica Chimica Acta*, Elsevier, v. 249, n. 1-2, p. 149–165, may 1996. ISSN 00098981. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009898196062857>>. Citado na página 41.

CASAROTO, A. R.; SELL, A. M.; NAGATA, J. Y.; BRUNETTA, E. V.; FRANCO, S. L.; HIDALGO, M. M. Manutenção da viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em extratos e formulações de própolis. *Acta Scientiarum. Health Science*, v. 34, n. 1, p. 59–66, jan 2012. ISSN 1807-8648. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/8954>>. Citado na página 49.

CEREDA, C. M. S.; TÓFOLI, G. R.; de Brito Junior, R. B.; JESUS, M. B. de; FRACETO, L. F.; GROPPPO, F. C.; ARAUJO, D. R. de; PAULA, E. de. Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. *Journal of liposome research*, v. 18, n. 4, p. 329–39, 2008. ISSN 1532-2394. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991066>>. Citado na página 41.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. *Journal of Parasitic Diseases*, Springer-Verlag, v. 34, n. 1, p. 1–13, apr 2010. ISSN 0971-7196. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12639-010-0006-3>>. Citado na página 16.

CHEESMAN, S. The Topoisomerases of Protozoan Parasites. *Parasitology Today*, Elsevier, v. 16, n. 7, p. 277–281, jul 2000. ISSN 01694758. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0169475800016975/fulltext>>. Citado na página 26.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in parasitology*, v. 19, n. 11, p. 502–8, nov 2003. ISSN 1471-4922. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580961>>. Citado na página 32.

CROFT, S. L.; DAVIDSON, R. N.; THORNTON, E. A. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 28 Suppl B, p. 111–8, oct 1991. ISSN 0305-7453. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1778888>>. Citado na página 27.

- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 1, p. 111–126, jan 2006. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1360270>&tool=pmcentrez&rendertype=ab>. Citado na página 24.
- DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; SILVA, J. B. B. da; FALCÃO, C. A. B.; ROSSI-BERGMANN, B.; MELO, A. L. de; SINISTERRA, R. D.; FRÉZARD, F. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 48, n. 1, p. 100–3, jan 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=310203>&tool=pmcentrez&rendertype=ab>. Citado na página 98.
- DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *The Biochemical journal*, v. 381, n. Pt 2, p. 405–12, jul 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1133846>&tool=pmcentrez&rendertype=ab>. Citado na página 25.
- DUAN, M. S.; ZHAO, N.; OSSURARDÓTTIR, I. B.; THORSTEINSSON, T.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: formation of aggregates and higher-order complexes. *International journal of pharmaceuticals*, v. 297, n. 1-2, p. 213–22, jun 2005. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885935>>. Citado na página 99.
- ESTEPA, V.; RODENAS, S.; MARTÍN, C. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real. Acad. Farm.*, v. 67, n. 3, p. 1–17, 2001. ISSN 1697428X. Citado na página 43.
- FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; ROSE, D. M.; PEARSON, A.; EZEKEWITZ, R. A.; HENSON, P. M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, v. 405, n. 6782, p. 85–90, may 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811223>>. Citado na página 72.
- FONG, D.; CHAN, M. M.; RODRIGUEZ, R.; GATELY, L. J.; BERMAN, J. D.; GROGL, M. Paromomycin resistance in *Leishmania tropica*: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 51, n. 6, p. 758–66, dec 1994. ISSN 0002-9637. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7810808>>. Citado na página 27.
- Franco de Lima, R. A.; JESUS, M. B. de; Saia Cereda, C. M.; TOFOLI, G. R.; CABEÇA, L. F.; MAZZARO, I.; FRACETO, L. F.; PAULA, E. de. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. *Journal of drug targeting*, v. 20, n. 1, p. 85–96, jan 2012. ISSN 1029-2330. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22047178>>. Citado na página 98.
- FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert opinion on drug delivery*, v. 7, n. 12, p. 1343–58, dec 2010. ISSN 1744-7593. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/47620111_New_delivery_strategies_for_the_old_pentavalent_antimonial_drugs>. Citado na página 101.

- FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, Molecular Diversity Preservation International, v. 14, n. 7, p. 2317–36, jan 2009. ISSN 1420-3049. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/14/7/2317>>. Citado 2 vezes nas páginas 25 and 67.
- FRÉZARD, F.; MARTINS, P. S.; BAHIA, A. P. C. O.; Le Moyec, L.; MELO, A. L. de; PIMENTA, A. M. C.; SALERNO, M.; SILVA, J. B. B. da; DEMICHELI, C. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/beta-cyclodextrin nanoassemblies. *International journal of pharmaceutics*, v. 347, n. 1-2, p. 102–8, jan 2008. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656054>>. Citado na página 98.
- FRÉZARD, F.; MICHALICK, M.; SOARES, C.; DEMICHELI, C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 33, n. 7, p. 841–846, jul 2000. ISSN 1678-4510. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{\&}pid=S0100-879X2000000700016{\&}lng=en{\&}nrm>. Citado 3 vezes nas páginas 30, 31, and 60.
- GOMES, Y. M.; Paiva Cavalcanti, M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, v. 175, n. 1, p. 45–52, jan 2008. ISSN 1090-0233. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/6649784{_}Diagnosis{_}of{_}canine{_}visceral{_}leishmaniasis{_}Biotech>. Citado na página 28.
- GRADONI, L.; DAVIDSON, R. N.; ORSINI, S.; BETTO, P.; GIAMBENEDETTI, M. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania infantum* and tissue distribution in mice. *Journal of drug targeting*, v. 1, n. 4, p. 311–6, jan 1993. ISSN 1061-186X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069573>>. Citado na página 32.
- GRANT, G.; BANSINATH, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, No longer published by Elsevier, v. 26, n. 1, p. 61–63, jan 2001. ISSN 10987339. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109873390140602X>>. Citado na página 30.
- GRIENSVEN, J. van; BOELAERT, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, v. 377, n. 9764, p. 443–4, feb 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/49775164{_}Combination{_}therapy{_}for{_}visceral{_}leishm>. Citado na página 24.
- GROBAS, S.; MENDEZ, J.; LAZARO, R.; BLAS, C. de; MATEO, G. G. Influence of Source and Percentage of Fat Added to Diet on Performance and Fatty Acid Composition of Egg Yolks of Two Strains of Laying Hens. *Poultry Science*, v. 80, n. 8, p. 1171–1179, aug 2001. ISSN 0032-5791. Disponível em: <<http://ps.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ps/80.8.1171>>. Citado na página 44.
- HAMMARTON, T. C.; MOTTRAM, J. C.; DOERIG, C. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Progress in cell cycle research*, v. 5, p. 91–101, jan 2003. ISSN 1087-2957. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593704>>. Citado na página 31.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical microbiology reviews*, v. 14, n. 2, p. 229–43, apr 2001. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<http://www>>.

pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88972{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 19.

HAZEKAMP, A.; VERPOORTE, R. Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated beta-cyclodextrin. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, v. 29, n. 5, p. 340–7, dec 2006. ISSN 0928-0987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934442>>. Citado na página 99.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, v. 66, n. 17, p. 2873–96, sep 2009. ISSN 1420-9071. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19499185>>. Citado na página 72.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. *Drug discovery today*, v. 18, n. 23-24, p. 1272–81, dec 2013. ISSN 1878-5832. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644613002687>>. Citado 2 vezes nas páginas 26 and 27.

JESUS, M. B. de; FRACETO, L. F.; MARTINI, M. F.; PICKHOLZ, M.; FERREIRA, C. V.; PAULA, E. de. Non-inclusion complexes between riboflavin and cyclodextrins. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 64, n. 6, p. 832–42, jun 2012. ISSN 2042-7158. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571261>>. Citado na página 99.

JHINGRAN, A.; CHAWLA, B.; SAXENA, S.; BARRETT, M. P.; MADHUBALA, R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 164, n. 2, p. 111–7, apr 2009. ISSN 0166-6851. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3039421{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>>. Citado na página 27.

KALAT, S. A. M.; KHAMESIPOUR, A.; BAVARSAD, N.; FALLAH, M.; KHASHAYARMANESH, Z.; FEIZI, E.; NEGhabi, K.; ABBASI, A.; JAAFARI, M. R. Experimental Parasitology Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of L . major lesion in BALB / c mice. *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*, Elsevier Inc., v. 143, p. 5–10, 2014. ISSN 0014-4894. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.013>>. Citado na página 31.

KIKUCHI, H.; CARLSSON, A.; YACHI, K.; HIROTA, S. Possibility of heat sterilization of liposomes. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, v. 39, n. 4, p. 1018–22, apr 1991. ISSN 0009-2363. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1893486>>. Citado na página 52.

KOTWANI, R. N.; GOKHALE, P. C.; BODHE, P. V.; KIRODIAN, B. G.; KSHIRSAGAR, N. A.; PANDYA, S. K. A comparative study of plasma concentrations of liposomal amphotericin B (L-AMP-LRC-1) in adults, children and neonates. *International journal of pharmaceuticals*, v. 238, n. 1-2, p. 11–5, may 2002. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11996806>>. Citado na página 30.

KURKOV, S. V. Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 453, n. 1, p. 167–180, 2013. ISSN 03785173. Citado na página 17.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, p. 881–827, 2005. ISSN 14625814. Citado 2 vezes nas páginas 18 and 25.

LASIC, D. *Liposomes : From Physics to Applications*. Elsevier, Amsterdam, v. 67, n. September, p. 580, 1993. Citado na página 29.

LAW, S. L.; HUANG, K. J.; CHIANG, C. H. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 63, n. 1-2, p. 135–40, jan 2000. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640587>>. Citado na página 30.

LAZANAS, M. C.; TSEKES, G. A.; PAPANDREOU, S.; HARHALAKIS, N.; SCANDALI, A.; NIKIFORAKIS, E.; SAROGLU, G. Liposomal amphotericin B for leishmaniasis treatment of AIDS patients unresponsive to antimony compounds. *AIDS (London, England)*, v. 7, n. 7, p. 1018–9, jul 1993. ISSN 0269-9370. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8357549>>. Citado na página 32.

LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. *Liposomes: Preparation, Characterization, and Preservation*. In: . John Wiley & Sons, Inc., 2006. p. 337–462. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9780470110546.ch7>>. Citado na página 44.

LIMA, M. I. S.; ARRUDA, V. O.; ALVES, E. V. C.; AZEVEDO, A. P. S. de; MONTEIRO, S. G.; PEREIRA, S. R. F. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. *Archives of Toxicology*, v. 84, n. 3, p. 227–232, nov 2009. ISSN 0340-5761. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19911167>>. Citado na página 26.

LOUKAS, Y. L.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G. Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 162, n. 1-2, p. 137–142, mar 1998. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.researchgate.net/publication/222244098>{_}Drugs{_}in{_}cyclodextrins{_}in{_}liposomes{_}A{_}novel{_}approach{_}to{_}the{_}chemical{_}stabil>. Citado na página 98.

MAIA, C.; ROLÃO, N.; NUNES, M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta tropica*, v. 103, n. 2, p. 150–5, aug 2007. ISSN 0001-706X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X07001398>>. Citado na página 47.

MARTINO, L. di; DAVIDSON, R. N.; GIACCHINO, R.; SCOTTI, S.; RAIMONDI, F.; CASTAGNOLA, E.; TASSO, L.; CASCIO, A.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; PETTOELLO-MANTOVANI, M.; BRYCESON, A. D. Treatment of visceral leishmaniasis in children with liposomal amphotericin B. *The Journal of pediatrics*, v. 131, n. 2, p. 271–7, aug 1997. ISSN 0022-3476. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9290615>>. Citado na página 32.

MARTINS, P. S.; RIBEIRO, R. R.; BAHIA, A. P. C.; M. Neto, R. L.; FRÉZARD, F.; PIMENTA, A. M. C.; MELO, A. L.; Le Moyec, L.; DEMICHELI, C. Physicochemical characterization of orally-active meglumine antimoniate/beta-cyclodextrin nanoassemblies: non-inclusion interactions and sustained drug release properties. *Brazilian Journal of Physics*, Sociedade Brasileira de Física, v. 39, n. 1A, p. 223–225, 2009. ISSN

0103-9733. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{\&}pid=S0103-97332009000200016{\&}lng=en{\&}nrm>. Citado na página 98.

MATOUSSI, N.; AMEUR, H. B.; AMOR, S. B.; FITOURI, Z.; BECHER, S. B. [Cardiotoxicity of n-methyl-glucamine antimoniate (Glucantime). A case report]. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 37 Suppl 3, p. S257–9, dec 2007. ISSN 0399-077X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054189>>. Citado na página 25.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R.; UENO, N.; WILSON, M.; CHANG, K.; DWYER, D.; LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C.; CHANG, K.; REED, S.; MCGWIRE, B.; SOONG, L.; GOTO, H.; LINDOSO, J. L.; DAVID, C.; CRAFT, N.; OLIVEIRA, C. de; BRODSKYN, C.; CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R.; HASHIGUCHI, Y.; HORST, R. ter; COLLIN, S.; RITMEIJER, K.; BOGALE, A.; DAVIDSON, R.; OKWOR, I.; UZONNA, J.; OLIVEIRA-NETO, M.; MATTOS, M.; SOUZA, C.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C.; MAROVICH, M.; LIRA, R.; SHEPARD, M.; FUCHS, G.; KRUETZER, R.; NUTMAN, T.; ZIJLSTRA, E.; MUSA, A.; KHALIL, E.; EL-HASSAN, I.; EL-HASSAN, A.; ANTINORI, S.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; PIOLINI, R.; ACQUAVIVA, V.; FOSCHI, A.; BAIOTTO, P.; COLOTTI, G.; FRANCESCHINI, S.; ILARI, A.; LESSA, H.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, A.; BACELLAR, O.; GUERREIRO, J.; ESFANDIARPOUR, I.; DABIRI, S.; BARRATT, G.; LEGRAND, P.; SUNDAR, S.; SINHA, P.; RAI, M.; VERMA, D.; NAWIN, K.; ALAM, S.; ARANA, B.; MENDOZA, C.; RIZZO, N.; KROEGER, A.; GONZALEZ, U.; PINART, M.; REVEIZ, L.; ALVAR, J.; SALAH, A. B.; MESSAOUD, N. B.; GUEDRI, E.; ZAATOUR, A.; ALAYA, N. B.; BETTAIEB, J.; HELLIER, I.; DEREURE, O.; TOURNILLAC, I.; PRATLONG, F.; GUILLOT, B.; DEDET, J.; JHA, T.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; SUNDAR, S.; JHA, T.; THAKUR, C.; BHATTACHARYA, S.; RAI, M.; SUNDAR, S.; SINHA, P.; JHA, T.; CHAKRAVARTY, J.; RAI, M.; KUMAR, N.; SOTO, J.; ARANA, B.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEGA, J.; DIAZ, A.; SOTO, J.; REA, J.; VALDERRAMA, M.; TOLEDO, J.; VALDA, L.; ARDILES, J.; SOTO, J.; REA, J.; BALDERRAMA, M.; TOLEDO, J.; SOTO, P.; VALDA, L.; SOTO, J.; TOLEDO, J.; VALDA, L.; BALDERRAMA, M.; REA, I.; PARRA, R.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; LLANOS-CUENTAS, A.; AREVALO, I.; WARD, B.; MATLASHEWSKI, G.; AREVALO, I.; TULLIANO, G.; QUISPE, A.; SPAETH, G.; MATLASHEWSKI, G.; LLANOS-CUENTAS, A.; AREVALO, I.; WARD, B.; MILLER, R.; MENG, T.; NAJAR, E.; ALVAREZ, E.; FIROOZ, A.; KHAMESIPOUR, A.; GHOORCHI, M.; NASSIRI-KASHANI, M.; ESKANDARI, S.; KHATAMI, A.; HERVAS, J.; MARTIN-SANTIAGO, A.; HERVAS, D.; ROJO, E.; MENA, A.; ROCAMORA, V.; GONZALEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J.; ALRAJHI, A.; IBRAHIM, E.; VOL, E. D.; KHAIRAT, M.; FARIS, R.; MAGUIRE, J.; NEGERA, E.; GADISA, E.; HUSSEIN, J.; ENGERS, H.; KURU, T.; GEDAMU, L.; ASILIAN, A.; SADEGHINIA, A.; FAGHIHI, G.; MOMENI, A.; HARANDI, A. A.; ASILIAN, A.; SADEGHINIA, A.; FAGHIHI, G.; MOMENI, A.; BUMB, R.; PRASAD, N.; KHANDELWAL, K.; AARA, N.; MEHTA, R.; GHIYA, B.; REITHINGER, R.; MOHSEN, M.; WAHID, M.; BISMULLAH, M.; QUINNELL, R.; DAVIES, C.; PRASAD, N.; GHIYA, B.; BUMB, R.; KAUSHAL, H.; SABOSKAR, A.; LEZAMA-DAVILA, C.; BUSTOS, M. G.; BARRIO, A.; RAMONEDA, C. P.; RAMOS, F.; MORA, M.; CONVIT, J.; CONVIT, J.; ULRICH, M.; ZERPA, O.; BORGES, R.; ARANZAZU, N.; VALERA, M.; CONVIT, J.; ULRICH, M.; POLEGRE, M.; AVILA, A.; RODRIGUEZ, N.; MAZZEDO, M.; BADARO, R.; LOBO, I.; NAKATANI, M.; MUINOS, A.; NETTO, E.; COLER, R.; BADARO, R.; LOBO, I.; MUNOS, A.; NETTO, E.; MODABBER, F.; CAMPOS-NETO,

A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, The Oxford University Press, v. 107, n. 1, p. 7–14, jan 2014. ISSN 1460-2393. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744570>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3869292>>. Citado na página 22.

Ministério da Saúde. *Leishmaniose Visceral: Recomendações clínicas para redução da letalidade*. [S.l.: s.n.], 2011. 1–78 p. ISBN 9788533417953. Citado 2 vezes nas páginas 23 and 24.

MIRÓ, G.; GÁLVEZ, R.; FRAILE, C.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R.; CURDI, J. L.; SÁNCHEZ, C. A.; HERNÁNDEZ, J. C.; PEÑA, A. E.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; GUILVARD, E.; ACEDO-SÁNCHEZ, C.; WOLF-ECHEVERRI, M.; SANCHÍS-MARÍN, M.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J.; AYLLON, T.; TESOIRO, M.; AMUSÁTEGUI, I.; VILLAESCUSA, A.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A.; MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L.; MAIA, C.; NUNES, M.; CRISTOVAO, J.; CAMPINO, L.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOZ-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; SOLANO-GALLEGU, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L.; QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PORTUS, M.; ALBEROLA, J.; TABAR, M.; ALTET, L.; FRANCINO, O.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L.; ROURA, X.; MAROLI, M.; PENNISI, M.; MUCCIO, T. D.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; SILVA, S. da; RABELO, P.; NDE, F. G.; RIBEIRO, R.; MELO, M.; RIBEIRO, V.; MICHALICK, M.; NAUCKE, T.; MENN, B.; MASSBERG, D.; LORENTZ, S.; AMUSÁTEGUI, I.; SAINZ, A.; AGUIRRE, E.; TESOIRO, M.; MORILLAS, F.; RABASCO, F. S.; OCAÑA, J.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; OCANA-WIHELMI, J.; ACEDO, C.; SANCHÍS-MARÍN, M.; GÁLVEZ, R.; DESCALZO, M.; MIRÓ, G.; JIMÉNEZ, M.; MARTÍN, O.; SANTOS-BRANDAO, F. D.; GUERRERO, I.; CUBERO, E.; MOLINA, R.; GÁLVEZ, R.; MIRÓ, G.; DESCALZO, M.; NIETO, J.; DADO, D.; MARTÍN, O.; CUBERO, E.; MOLINA, R.; SOLANO-GALLEGU, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G.; BANETH, G.; KOUTINAS, A.; SOLANO-GALLEGU, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L.; ALVAR, J.; MOLINA, R.; ANDRÉS, M. S.; TESOIRO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; ANDRÉS, M. S.; BOGGIO, J.; RODRÍGUEZ, F.; MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLEZ, F.; CASTILLO, J.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J.; NOLI, C.; AUXILIA, S.; MATEO, M.; MAYNARD, L.; VISCHER, C.; BIANCIARDI, P.; MIRÓ, G.; MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; PICILLO, E.; NEGLIA, G.; VESCIO, F.; GRAVINO, A.; MIRÓ, G.; OLIVA, G.; CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; MORTARINO, M.; VISCHER, C.; BIANCIARDI, P.; GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F.; TRAVI, B.; FERRO, C.; CADENA, H.; MONTOYA-LERMA, J.; ADLER, G.; RIBEIRO, R.; MOURA, E.; PIMENTEL, V.; SAMPAIO, W.; SILVA, S.; SCHETTINI, D.; ALVES, C.; MELO, F.; TAFURI, W.; DEMICHELI, C.; GUARGA, J.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M.; PERIBANEZ, M.; CASTILLO, J.; MOLINA, R.; KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; MANCIANTI, F.; MECIANI, N.; SAINZ, A.; DELGADO, S.; AMUSATEGUI, I.; TESOIRO, M.; CARMENES, P.; BANETH, G.; SHAW, S.; LING, G.; RUBY, A.; HARROLD, D.; JOHNSON, D. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasites & Vectors*, BioMed Central, v. 4, n. 1, p. 52, 2011. ISSN 1756-3305. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-52>>. Citado na página 28.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S.; ASIYANBOLA, B.; SOBOYEJO, W.; ALEXIS, F.; RHEE, J.; RICHIE, J.; RADOVIC-MORENO, A.; LANGER, R. R.; FAROKHZAD, O.; KOO, O.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H.; LOBENBERG, R.; KINGSLEY, J.; DOU, H.; MOREHEAD, J.; RABINOW, B.; GENDELMAN, H.; DESTACHE, C.; CARUTHERS, S.; WICKLINE, S.; LANZA, G.; MUELLER, R.; MAEDER, K.; GOHLA, S.; LA-VAN, D.; MCGUIRE, T.; LANGER, R.; KECK, C.; KOBIERSKI, S.; MAULUDIN, R.; MULLER, R.; SHRIVASTAVA, S.; MUHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; MEHNERT, W.; MADER, K.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; YAMAMOTO, H.; SCHAFER, U.; TAKEUCHI, H.; LEHR, C.; AL. et; JIANG, B.; HU, L.; GAO, C.; SHEN, J.; CHEN, X.; YOUNG, T.; SARKARI, M.; WILLIAMS, R.; JOHNSTON, K.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALIEMAN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E.; ALLEMANN, E.; LEROUX, J.; GURNY, R.; DOELKER, E.; TOTH, J.; KARDOS-FODOR, A.; HALASZ-PETERFI, S.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.; AMMOURY, N.; BENITA, S.; GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M.; ILLUM, L.; DAVIS, S.; MOINARD-CHECOT, M.; CHEVALIER, Y.; BRIANCON, S.; BENEY, L.; FESSI, H.; TROTTA, M.; DEBERNARDI, F.; CAPUTO, O.; NIWA, T.; TAKEUCHI, H.; HINO, T.; NOHARA, M.; KAWASHIMA, Y.; JUNG, J.; PERRUT, M.; DEA, S.; GRAZIANI, D.; MILLER, D.; CONTINETTI, R.; REVERCHON, E.; PORTA, G.; TADDEO, R.; REVERCHON, E.; PORTA, G.; CHATTOPADHYAY, P.; GUPTA, R.; CHATTOPADHYAY, P.; SHEKUNOV, B.; SEITZINGER, J.; JAGANNATHAN, R.; IRVIN, G.; BLANTON, T.; JAGANNATHAN, S.; CHIELLINI, F.; BARTOLI, C.; DINUCCI, D.; PIRAS, A.; ANDERSON, R.; CROUCHER, T.; SOPPIMATH, K.; AMINABHAVI, T.; KULKARNI, A.; RUDZINSKI, W.; GOMEZ-GAETE, C.; TSAPIS, N.; BESNARD, M.; BOCHOT, A.; FATTAL, E.; MUSUMECI, T.; VENTURA, C.; GIANNONE, I.; RUOZI, B.; MONTENEGRO, L.; PIGNATELLO, R.; AL. et; JEONG, Y.; SEO, S.; PARK, I.; LEE, H.; KANG, I.; AKAIKE, T.; AL. et; SHENOY, D.; AMIJI, M.; DAMGE, C.; MAINCENT, P.; UBRICH, N.; SINGH, J.; PANDIT, S.; BRAMWELL, V.; ALPAR, H.; LIU, J.; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X.; ZHANG, N.; PING, Q.; HUANG, G.; XU, W.; CHENG, Y.; HAN, X.; LIU, J.; GONG, T.; FU, H.; WANG, C.; WANG, X.; CHEN, Q.; AL. et; PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; SCHOUBBEN, A.; BONINA, F.; ROSSI, C.; AL. et; SHAH, K.; DATE, A.; JOSHI, M.; PATRAVALE, V.; KAUR, I.; BHANDARI, R.; BHANDARI, S.; KAKKAR, V.; BLASI, P.; GIOVAGNOLI, S.; SCHOUBBEN, A.; RICCI, M.; ROSSI, C.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G.; ARRUEBO, M.; FERNANDEZ-PACHECO, R.; IBARRA, M.; SANTAMARIA, J.; ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T.; JAIN, T.; RICHEY, J.; STRAND, M.; LESLIE-PELECKY, D.; FLASK, C.; LABHASETWAR, V.; JAIN, P.; EL-SAYED, I.; EL-SAYED, M.; GILJOHANN, D.; SEFEROS, D.; PATEL, P.; MILLSTONE, J.; ROSI, N.; MIRKIN, C.; SLOWING, I.; VIVERO-ESCOTO, J.; WU, C.; LIN, V.; GHOSH, P.; HAN, G.; DE, M.; KIM, C.; ROTELLO, V.; LI, D.; LI, G.; GUO, W.; LI, P.; WANG, E.; WANG, J.; SMITH, A.; DUAN, H.; MOHS, A.; NIE, S.; YEZHELYEV, M.; GAO, X.; XING, Y.; AL-HAJJ, A.; NIE, S.; O-REGAN, R.; BROMBERG, L.; BAE, Y.; DIEZI, T.; ZHAO, A.; KWON, G.; SEOW, W.; XUE, J.; YANG, Y.; RAPOPORT, N.; KOO, O.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H.; PAPAGIANNAROS, A.; LEVCHENKO, T.; HARTNER, W.; MONGAYT, D.; TORCHILIN, V.; CESUR, H.; RUBINSTEIN, I.; PAI, A.; ONYUKSEL, H.; KHATRI, K.; GOYAL, A.; GUPTA, P.; MISHRA, N.; MEHTA, A.; VYAS, S.; EDWARDS, K.; DUAN, F.; BAEUMNER, A.; MARCH, J.; DRUMMOND, D.; MEYER, O.; HONG, K.; KIRPOTIN, D.; PAPAHAADJOPOULOS, D.; ZHANG, L.; GAO, H.; CHEN, L.; WU, B.; ZHENG, Y.; LIAO, R.; AL. et; KAWASHIMA, Y.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; FUJIOKA, S.; HINO, T.; CARINO, G.; JACOB, J.; MATHIOWITZ, E.; WANG, N.; WU, X.; LI, J.; MUKERJEE, A.; SINHA, V.; PRUTHI, V.; PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU,

H.; WEI, G.; AL. et; LIN, Y.; CHUNG, C.; CHEN, C.; LIANG, H.; CHEN, S.; SUNG, H.; SAHOO, S.; LABHASETWAR, V.; GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E.; ALENZO, M.; LOSA, C.; CALVO, P.; VILA-JATO, J.; NAGAOKA, T.; FUKUDA, T.; YOSHIDA, S.; NISHIMURA, H.; YU, D.; KURODA, S.; AL. et; TSUTSUI, Y.; TOMIZAWA, K.; NAGITA, M.; MICHIEUE, H.; NISHIKI, T.; OHMORI, I.; AL. et; SUNICHI, K.; TAKESHI, K.; SUNICHI, K.; JOOHEE, J.; KATSUYUKI, T.; JUNG, J.; MATSUZAKI, T.; TATEMATSU, K.; OKAJIMA, T.; TANIZAWA, K.; KURODA, S.; SHISHIDO, T.; YONEZAWA, D.; IWATA, K.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; AL. et; KRAULAND, A.; BERNKOP-SCHNURCH, A.; LEITNER, V.; MARSCHUTZ, M.; BERNKOP-SCHNURCH, A.; WISSING, S.; KAYSER, O.; MULLER, R.; PANKHURST, Q.; CONNOLLY, J.; JONE, S.; DOBSON, J.; BRILEY-SAEBO, K.; BJORNERUD, A.; GRANT, D.; AHLSTROM, H.; BERG, T.; KINDBERG, G.; NISHIJIMA, S.; MISHIMA, F.; TERADA, T.; TAKEDA, S.; HAFELI, U.; PAUER, G.; FAILING, S.; TAPOLSKY, G.; CHUNFU, Z.; JINQUAN, C.; DUANZHI, Y.; YONGXIAN, W.; YANLIN, F.; JIAJU, T.; ALLY, J.; MARTIN, B.; KHAMESEE, M.; ROA, W.; AMIRFAZLI, A.; DAMES, P.; GLEICH, B.; FLEMMER, A.; HAJEK, K.; SEIDL, N.; WIEKHORST, F.; MARTIN, A.; FINLAY, W.; ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R.; PARAK, F.; HULIN, P.; BERGEMANN, C.; AL. et; LUBBE, A.; BERGEMANN, C.; HUHN, W.; FRICKE, T.; RIESS, H.; BROCK, J.; AL. et; ALBERTS, D.; SURWIT, E.; PENG, Y.; MCCLOSKEY, T.; RIVEST, R.; GRAHAM, V.; AL. et; WUELFING, W.; GROSS, S.; MILES, D.; MURRAY, R.; OISHI, M.; NAKAOGAMI, J.; ISHII, T.; NAGASAKI, Y.; BHUMKAR, D.; JOSHI, H.; SASTRY, M.; POKHARKAR, V.; PARK, C.; OH, K.; LEE, S.; KIM, C.; BAWARSKI, W.; CHIDLOWSKY, E.; BHARALI, D.; MOUSA, S.; ARYA, H.; KAUL, Z.; WADHWA, R.; TAIRA, K.; HIRANO, T.; KAUL, S.; HEZINGER, A.; TEBMAR, J.; GOPFERICH, A.; DERFUS, A.; CHAN, W.; BHATIA, S.; CHAN, W.; SHIAO, N.; LU, P.; OH, S.; LIM, S.; SO, M.; XU, C.; LOENING, A.; GAMBHIR, S.; RAO, J.; CAI, W.; SHIN, D.; CHEN, K.; GHEYSENS, O.; CAO, Q.; WANG, S.; AL. et; WU, X.; LIU, H.; LIU, J.; HALEY, K.; TREADWAY, J.; LARSON, J.; AL. et; GOLDMAN, E.; ANDERSON, G.; TRAN, P.; MATTOUSSI, H.; CHARLES, P.; MAURO, J.; TULLY, E.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; OKENNEDY, R.; ZHU, L.; ANG, S.; LIU, W.; GOLDMAN, E.; CLAPP, A.; ANDERSON, G.; UYEDA, H.; MAURO, J.; MEDINTZ, I.; AL. et; GAUCHER, G.; DUFRESNE, M.; SANT, V.; KANG, N.; MAYSINGER, D.; LEROUX, J.; GANTA, S.; DEVALAPALLY, H.; SHAHIWALA, A.; AMIJI, M.; LEE, E.; OH, K.; KIM, D.; YOUN, Y.; BAE, Y.; LEE, E.; NA, K.; BAE, Y.; WANG, C.; HSIUE, G.; HUSSEINI, G.; MYRUP, G.; PITT, W.; CHRISTENSEN, D.; RAPOPORT, N.; MUNSHI, N.; RAPOPORT, N.; PITT, W.; MYHR, G.; MOAN, J.; HOWARD, B.; GAO, A.; LEE, S.; SEO, M.; RAPOPORT, N.; NAKAYAMA, M.; OKANO, T.; MIYAZAKI, T.; KOHORI, F.; SAKAI, K.; YOKOYAMA, M.; NAKAYAMA, M.; CHUNG, J.; MIYAZAKI, T.; YOKOYAMA, M.; SAKAI, K.; OKANO, T.; LASIC, D.; PAIN, D.; DAS, P.; GHOSH, P.; BACHHAWAT, B.; TORCHILIN, V.; LEVCHENKO, T.; WHITEMAN, K.; YAROSLAVOV, A.; TSATSAKIS, A.; RIZOS, A.; GU, F.; KARNIK, R.; WANG, A.; ALEXIS, F.; LEVY-NISSENBAUM, E.; HONG, S.; AL. et; MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K.; FAROKHZAD, O.; JON, S.; KHADEMHOSEINI, A.; TRAN, T.; LAVAN, D.; LANGER, R.; BHADRA, D.; BHADRA, S.; JAIN, S.; JAIN, N.; MEHREN, M.; ADAMS, G.; WEINER, L.; JIN, H.; VARNER, J.; LEAMON, C.; REDDY, J.; ANTONY, A.; LU, Y.; LOW, P.; SUDIMACK, J.; LEE, R.; REGE, B.; KAO, J.; POLLI, J.; PAN, J.; FENG, S.; OYEWUMI, M.; MUMPER, R.; KOHLER, G.; MILSTEIN, C.; KOCBEK, P.; OBERMAJER, N.; CEGNAR, M.; KOS, J.; KRISTL, J.; STEINHAUSER, I.; SPANKUCH, B.; STREBHARDT, K.; LANGER, K.; SIEVERS, E.; LARSON, R.; STADTMAUER, E.; ESTEY, E.; BROSS, P.; BEIT, J.; CHEN, G.; CHEN, X.; DUFFY, E.; KIEFFER, L.; AL. et; LEE, J.; HESSELBERTH,

J.; MEYERS, L.; ELLINGTON, A.; GOLD, L.; TUERK, C.; LEVY-NISSENBAUM, E.; RADOVIC-MORENO, A.; WANG, A.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O.; SAMPSON, T.; PHILLIPS, J.; LOPEZ-COLON, D.; ZHU, Z.; XU, Y.; TAN, W.; LEE, J.; STOVALL, G.; ELLINGTON, A.; SVENSON, S.; TOMALIA, D.; YANG, W.; CHENG, Y.; XU, T.; WANG, X.; WEN, L.; YIYUN, C.; TONGWEN, X.; RONGQIANG, F.; SINGH, B.; FLORENCE, A.; VANDAMME, T.; BROBECK, L.; DUFES, C.; UCHEGBU, I.; SCHATZLEIN, A.; MOUSA, S.; LIM, E.; DANTHI, T.; BEDNARSKI, M.; LI, K.; DUFES, C.; OLIVIER, J.; GAILLARD, F.; GAILLARD, A.; COUET, W.; MULLER, J.; WERNIG, K.; GRIESBACHER, M.; ANDREAE, F.; HAJOS, F.; WAGNER, J.; MOSGOELLER, W.; AL. et; TORCHILIN, V.; BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Elsevier, v. 6, n. 1, p. 9–24, feb 2010. ISSN 15499634. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S154996340900094X>>. Citado na página 16.

MOMENI, A.; RASOOLIAN, M.; MOMENI, A.; NAVAEI, A.; EMAMI, S.; SHAKER, Z.; MOHEBALI, M.; KHOSHDEL, A. Development of liposomes loaded with anti-leishmanial drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of liposome research*, Informa Healthcare USA, Inc. New York, v. 23, n. 2, p. 134–44, jun 2013. ISSN 1532-2394. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/08982104.2012.762519>>. Citado 2 vezes nas páginas 33 and 101.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in parasitology*, v. 18, n. 9, p. 399–405, sep 2002. ISSN 1471-4922. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377257>>. Citado 3 vezes nas páginas 16, 18, and 22.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunological reviews*, v. 240, n. 1, p. 286–96, mar 2011. ISSN 1600-065X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349100>>. Citado 2 vezes nas páginas 16 and 20.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 366, n. 9496, p. 1561–77, jan 2005. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257344>>. Citado 2 vezes nas páginas 20 and 25.

NEW, R. R.; CHANCE, M. L. Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis by liposome-entrapped Pentostam. *Acta tropica*, v. 37, n. 3, p. 253–6, sep 1980. ISSN 0001-706X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6106363>>. Citado na página 31.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*, v. 2, n. 2, p. 135–46, may 2010. ISSN 0974-8245. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2889653&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado 2 vezes nas páginas 31 and 34.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, Academic Press, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun 1979. ISSN 00032697. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269779907383>>. Citado na página 44.

OKU, N.; TOKUDOME, Y.; NAMBA, Y.; SAITO, N.; ENDO, M.; HASEGAWA, Y.; KAWAI, M.; TSUKADA, H.; OKADA, S. Effect of serum protein binding on real-time trafficking of

liposomes with different charges analyzed by positron emission tomography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Elsevier, v. 1280, n. 1, p. 149–154, apr 1996. ISSN 00052736. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005273695002839>>. Citado na página 71.

OWAIS, M.; GUPTA, C. M. Targeted drug delivery to macrophages in parasitic infections. *Current drug delivery*, v. 2, n. 4, p. 311–8, oct 2005. ISSN 1567-2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16305434>>. Citado na página 31.

PAHO. Epidemiological Report of the Americas. *Report Leishmaniasis*, v. 3, p. 2–5, 2015. Disponível em: <<http://new.paho.org/leishmaniasis>>. Citado 5 vezes nas páginas , 16, 18, 19, and 22.

PAPAGIANNAROS, A.; BORIES, C.; DEMETZOS, C.; LOISEAU, P. M. Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie*, v. 59, n. 10, p. 545–50, dec 2005. ISSN 0753-3322. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325367>>. Citado na página 32.

PATHAK, M. K.; YI, T. Sodium Stibogluconate Is a Potent Inhibitor of Protein Tyrosine Phosphatases and Augments Cytokine Responses in Hemopoietic Cell Lines. *The Journal of Immunology*, American Association of Immunologists, v. 167, n. 6, p. 3391–3397, sep 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/167/6/3391.full>>. Citado na página 26.

PINTO, L. M. A.; FRACETO, L. F.; SANTANA, M. H. A.; PERTINHEZ, T. A.; JUNIOR, S. O.; PAULA, E. de. Physico-chemical characterization of benzocaine-beta-cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 39, n. 5, p. 956–63, oct 2005. ISSN 0731-7085. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040222>>. Citado na página 98.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 9, p. 1790–1798, 2006. ISSN 0918-6158. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/29.1790?from=CrossRef>>. Citado na página 16.

RIBEIRO, R. R.; FERREIRA, W. A.; MARTINS, P. S.; NETO, R. L. M.; ROCHA, O. G. F.; Le Moyec, L.; DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Prolonged absorption of antimony(V) by the oral route from non-inclusion meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin conjugates. *Biopharmaceutics & drug disposition*, v. 31, n. 2-3, p. 109–19, mar 2010. ISSN 1099-081X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20014042>>. Citado 2 vezes nas páginas 96 and 98.

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; PIMENTEL, V. M.; SAMPAIO, W. M.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. A.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; TAFURI, W. L.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; MICHALICK, M. S. M. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 52, n. 7, p. 2564–72, jul 2008. ISSN 1098-6596. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2443916&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 22.

ROBERTS, W. L.; RAINEY, P. M. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 37, n. 9, p. 1842–6, sep 1993. ISSN 0066-4804. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=188079>&tool=pmcentrez&rendertype=ab>. Citado na página 67.

RONGEN, H.; BULT, A.; BENNEKOM, W. van. Liposomes and immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, v. 204, n. 2, p. 105–133, 1997. ISSN 00221759. Citado na página 30.

ROUSER, G.; FKEISCHER, S.; YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, v. 5, n. 5, p. 494–6, may 1970. ISSN 0024-4201. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5483450>>. Citado na página 41.

RUSSO, R.; NIGRO, L. C.; MINNITI, S.; MONTINERI, A.; GRADONI, L.; CALDEIRA, L.; DAVIDSON, R. N. Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). *The Journal of infection*, v. 32, n. 2, p. 133–7, mar 1996. ISSN 0163-4453. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8708370>>. Citado na página 32.

SAHA, A. K.; MUKHERJEE, T.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 19, n. 3, p. 195–200, jun 1986. ISSN 0166-6851. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3736592>>. Citado na página 26.

Salerno Pimentel, I. A.; PALADI, C. d. S.; KATZ, S.; de Souza Júdice, W. A.; CUNHA, R. L. O. R.; BARBIÉRI, C. L. In vitro and in vivo activity of an organic tellurium compound on *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. *PloS one*, Public Library of Science, v. 7, n. 11, p. e48780, jan 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048780>>. Citado na página 45.

SAMAD, A.; SULTANA, Y.; AQIL, M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current drug delivery*, v. 4, n. 4, p. 297–305, oct 2007. ISSN 1567-2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979650>>. Citado na página 28.

SCHETTINI, D.; Costa Val, A.; SOUZA, L.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O.; MELO, M.; MICHALICK, M.; FRÉZARD, F. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 36, n. 2, p. 269–272, feb 2003. ISSN 1678-4510. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2003000200015&lng=en&nrm>. Citado na página 101.

SCHETTINI, D. A.; RIBEIRO, R. R.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O. G. F.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *International journal of pharmaceuticals*, v. 315, n. 1-2, p. 140–7, jun 2006. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306001402>>. Citado na página 31.

SCHWENDENER, R.; LAGOCKI, P.; RAHMAN, Y. The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Elsevier, v. 772, n. 1, p. 93–101, apr 1984. ISSN 00052736. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005273684905212>>. Citado na página 72.

SHAHIAN, M.; ALBORZI, A. Effect of meglumine antimoniate on the pancreas during treatment of visceral leishmaniasis in children. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, v. 15, n. 6, p. CR290–3, jun 2009. ISSN 1643-3750. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478699>>. Citado na página 25.

SHAKED-MISHAN, P.; ULRICH, N.; EPHROS, M.; ZILBERSTEIN, D. Novel Intracellular SbV Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 6, p. 3971–3976, nov 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11110784>>. Citado na página 67.

SHAW, D. J. *Introduction to colloid and surface chemistry*. [S.l.]: Butterworth-Heinemann, 1992. 306 p. ISBN 9780750611824. Citado na página 42.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina Pathology and pathogenesis of canine visceral leishmaniasis. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 1, n. 1, p. 20–31, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 24 and 28.

SILVA, S. M. da; AMORIM, I. F. G.; RIBEIRO, R. R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 2858–67, jun 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/56/6/2858.short>>. Citado 2 vezes nas páginas 23 and 27.

SINDERMAN, H.; CROFT, S. L.; ENGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Medical microbiology and immunology*, v. 193, n. 4, p. 173–80, nov 2004. ISSN 0300-8584. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14513375>>. Citado 2 vezes nas páginas 24 and 27.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, v. 5, n. 6, p. 485–97, jun 2012. ISSN 1995-7645. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764512600844>>. Citado na página 26.

SINHA, R.; ROYCHOUDHURY, J.; PALIT, P.; ALI, N. Cationic Liposomal Sodium Stibogluconate (SSG), a Potent Therapeutic Tool for Treatment of Infection by SSG-Sensitive and -Resistant *Leishmania donovani*. v. 59, n. 1, p. 344–355, 2015. Citado na página 31.

SOARES, L. A.; LEAL, A. F. V. B.; FRACETO, L. F.; MAIA, E. R.; RESCK, I. S.; KATO, M. J.; Sousa Gil, E.; SOUSA, A. R.; CUNHA, L. C.; REZENDE, K. R. Host–guest system of 4-nerolidylcatechol in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation, characterization and molecular modeling. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 64, n. 1-2, p. 23–35, jan 2009. ISSN 0923-0750. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10847-009-9532-y>>. Citado na página 98.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G.; The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, v. 4, n. 1, p. 86, jan 2011. ISSN 1756-3305. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/86>>. Citado na página 22.

SOUZA, W. de. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochemistry and cell biology*, v. 123, n. 1, p. 1–18, jan 2005. ISSN 0948-6143. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685438>>. Citado na página 19.

STUART, D. D.; KAO, G. Y.; ALLEN, T. M. A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer gene therapy*, v. 7, n. 3, p. 466–75, mar 2000. ISSN 0929-1903. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766353>>. Citado na página 30.

SUMANTRAN, V. N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 731, p. 219–36, jan 2011. ISSN 1940-6029. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21516411>>. Citado na página 49.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and clinical risk management*, v. 3, n. 5, p. 733–40, oct 2007. ISSN 1176-6336. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2376078&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 27.

SUNDAR, S.; SINHA, P. K.; VERMA, D. K.; KUMAR, N.; ALAM, S.; PANDEY, K.; KUMARI, P.; RAVIDAS, V.; CHAKRAVARTY, J.; VERMA, N.; BERMAN, J.; GHALIB, H.; ARANA, B. Ambisome plus miltefosine for Indian patients with kala-azar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, n. 2, p. 115–7, feb 2011. ISSN 1878-3503. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035920310002385>>. Citado na página 24.

TEMPONE, A. G.; JR., H. F. d. A. *Nanoformulações de antimônio pentavalente encapsuladas em lipossomos contendo fosfatidilserina demonstram maior eficácia contra Leishmaniose Visceral experimental*. 2008. 131–136 p. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/7175>>. Citado 2 vezes nas páginas 33 and 101.

TEMPONE, A. G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A. L.; MORTARA, R. A.; ANDRADE, H. F. de. Targeting Leishmania (L.) chagasi amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 54, n. 1, p. 60–8, jul 2004. ISSN 0305-7453. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163652>>. Citado 3 vezes nas páginas 66, 71, and 72.

TORCHILIN, V. P. Interview with Vladimir P Torchilin: liposomal carriers for drug delivery. *Therapeutic delivery*, v. 4, n. 5, p. 537–8, may 2013. ISSN 2041-5990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647271>>. Citado 2 vezes nas páginas 28 and 29.

TORRE-CISNEROS, J.; PRADA, J. L.; VILLANUEVA, J. L.; VALVERDE, F.; SÁNCHEZ-GUIJÓ, P. Successful treatment of antimony-resistant cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 18, n. 6, p. 1024–5, jun 1994. ISSN 1058-4838. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8086540>>. Citado na página 32.

TSAO, J.-Y.; WU, C.-P.; TSAI, H.-H.; PENG, K.-C.; LIN, P.-Y.; SU, S.-Y.; CHEN, L.-D.; TSAI, F.-J.; TSAI, Y. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation on the aqueous solubility, structure, thermal stability, antioxidant activity, and tyrosinase inhibition of paeonol. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 72, n. 3-4, p. 405–411, jul 2011. ISSN

0923-0750. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10847-011-0003-x>>. Citado na página 98.

USKOKOVIC, V.; CASTIGLIONE, Z.; CUBAS, P.; ZHU, L.; LI, W.; HABELITZ, S. Zeta-potential and particle size analysis of human amelogenins. *Journal of dental research*, International Association for Dental Research, v. 89, n. 2, p. 149–53, feb 2010. ISSN 1544-0591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20040742http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3318063>>. Citado na página 43.

Van Axel Castelli, V.; TRIVIERI, G.; ZUCCHELLI, I.; BRAMBILLA, L.; BARBUZZI, T.; CASTIGLIONI, C.; PACI, M.; ZERBI, G.; ZANOL, M. Characterisation of an inclusion complex between cladribine and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 97, n. 9, p. 3897–906, sep 2008. ISSN 1520-6017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200519>>. Citado na página 98.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 38, p. 39925–39932, jul 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15252045>>. Citado na página 25.

YAN, S.; LI, F.; DING, K.; SUN, H. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, v. 8, n. 6, p. 689–97, jul 2003. ISSN 0949-8257. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12827457>>. Citado 2 vezes nas páginas 67 and 68.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *International journal of antimicrobial agents*, v. 13, n. 4, p. 243–8, feb 2000. ISSN 0924-8579. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10755238>>. Citado na página 32.

ZAGHLOUL, I. Y.; AL-JASSER, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 98, n. 8, p. 793–800, dec 2004. ISSN 0003-4983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15667712>>. Citado na página 25.

ZUIDAM, N. J.; LEE, S. S. L.; CROMMELIN, D. J. A. Sterilization of liposomes by heat treatment. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 11, p. 1591–1596, 1993. ISSN 1573-904X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1018916518515>>. Citado na página 52.

A Anexo

Neste anexo se colocam os procedimentos realizados na tentativa do desenvolvimento do complexo ciclodextrina-AME.

A.1 Preparo e caracterização do complexo AME em Hidroxipropil β ciclodextrina

Foi preparada por liofilização, uma formulação de AME complexado com HP- β CD na proporção 1:1 (razão molar). Na forma de um “cake” (pastilha) estável, compacto e de boa aparência, características físicas desejadas para a formulação, sem perda significativa da quantidade do liofilizado obtido. Resultados semelhantes foram obtidos com uso do método de secagem por spray drying, obtendo-se um pó solto de partículas homogêneas e de cor branca

A.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia óptica acoplada a liofilização (FDM)

Para determinação das temperaturas de micro e macro colapso e do ponto de congelamento dos liofilizados (complexo AME: HP- β CD, AME livre e HP-CD) foram feitas medidas com DSC que revelaram: para a HP- β CD: temperatura de micro colapso (-16,1 °C), temperatura de macro colapso (-9,4 °C), com um ponto de congelamento de (-22,7 °C). O liofilizado do antimoniato de meglumina livre apresentou temperatura de micro colapso (-45,7 °C), temperatura de macro colapso (-40,5 °C) e ponto de congelamento (-23,2 °C). Já o complexo AME:HP- β CD apresentou: temperatura de micro colapso (-16,7°C), temperatura de macro colapso (-13,5 °C) e ponto de congelamento (-20,3 °C), como mostram as micrografias da figura 32. A complexação aumentou bastante a temperatura de colapso, o que indica que a liofilização é um processo viável de ser adotado, em maiores escalas sem perda da estrutura porosa dos compostos, após liofilização.

A.3 Medidas de espalhamento de luz dinâmico para avaliar possível agregação do complexo HP- β CD:AME por DLS

Medidas de DLS foram feitas em amostras do complexo AME-CD para avaliar possível agregação dos mesmos. Primeiramente é preciso dizer que os complexos fármaco-CD não tem tamanho para ser detectados no DLS.

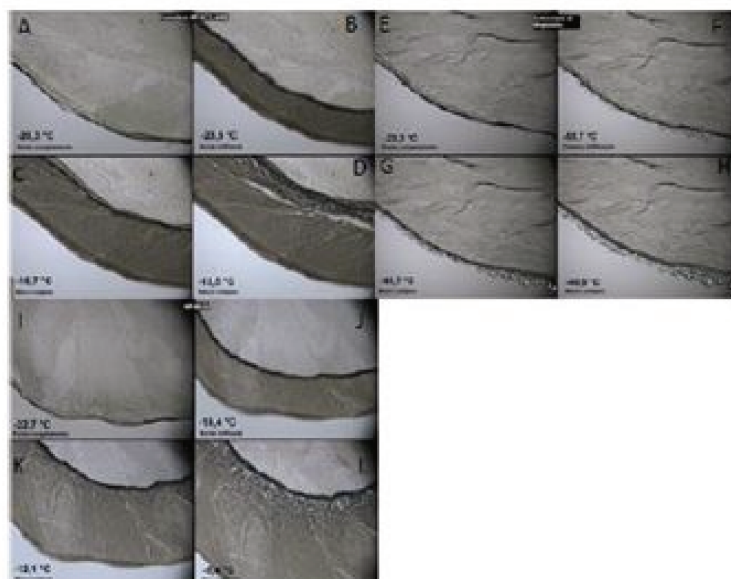


Figura 32 – Microfotografias das amostras liofilizadas: (A,B,C,D) complexo AME:HP- β CD revelando o ponto de congelamento, borda liofilização, micro e macro colapso, respectivamente; (E,F,G,H) antimoniato de meglumina livre revelando o ponto de congelamento, borda liofilizada, micro e macro colapso, respectivamente; (I,J,K,L) ponto de congelamento, borda liofilizada, micro e macro colapso. Apesar de o processo de liofilização ter se mostrado apropriado ao preparo do complexo AME:HP- β CD, algumas características físicas macroscópicas do complexo mostraram-se instáveis após re-solubilização, nos levando a questionar a estabilidade do mesmo. Desta forma, usamos medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para investigar a presença de possíveis agregados macromoleculares, no complexo AME:HP- β CD.

Os resultados obtidos a partir da medição do diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão (PDI) nas amostras do complexo AME:HP- β CD, 1:1 suspenso em água desionizada antes do processo de liofilização, durante quatro dias se encontram na tabela 6. Observa-se um aumento do tamanho das partículas durante os 4 dias analisados, começando nas dimensões mínimas limites do equipamento (ca. 10 nm) e atingindo 633 nm, no último dia da medição. Sintomaticamente, a polidispersão manteve-se alta em todas as medidas, indicando heterogeneidade das partículas. Estes dados indicam instabilidade do complexo AME:HP- β CD, possivelmente por formação de agregados macromoleculares, envolvendo muitas moléculas do fármaco e do oligossacarídeo, até atingir as dimensões compatíveis com as medidas de espalhamento de luz dinâmico.

Quando o complexo foi liofilizado, depois de um dia de agitação, e solubilizado em água desionizada a média dos tamanhos obtidos se mostrou semelhante ao do dia 4 (ca. 610 nm). De forma semelhante, quando o liofilizado foi solubilizado em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 com NaCl 150 mM, registramos diâmetro médio de partículas de 428 nm, como mostra a tabela 7.

Tabela 6 – Diâmetro médio e polidispersão (PDI) em amostras de AME: HP- β CD (proporção molar 1:1) antes do processo de liofilização, medidos durante 4 dias.

Complexo HP-βCD:AME (1:1) sem liofilização		
DIAS	Tamanho	PDI
1	9,9	1
2	119,0	0,812
3	279,1	0,886
4	633,0	0,766

Tabela 7 – Diâmetro médio e PDI de amostra do complexo AME:HP- β CD na proporção molar 1:1; liofilizado após 1 dia de equilíbrio e ressuspensão em água desionizada ou tampão HEPES 20 mM pH 7,4 + NaCl 150 Mm

Complexo HP-βCD:AME (1:1) com liofilização		
Solubilizante	Tamanho (nm)	PDI
Água desionizada	610,4	0,361
HEPES 20 mM,pH 7,4+NaCl 150 mM	428,1	0,316

Com a técnica de spray-drying o tamanho médio das partículas, depois de 12 h equilíbrio e ressuspensão em água desionizada foi $>1 \mu\text{m}$. Em comparação com os dados da tabela 7, aparentemente os processos de desidratação (liofilização ou spray-drying) aceleram a agregação dos complexos HP- β CD. De qualquer maneira (com ou sem liofilização), esta agregação é indesejável para uma formulação de uso parenteral, e também inviabilizaria o preparo dos sistemas de duplo carregamento (AME em ciclodextrina em lipossomas) proposto. Conduzimos medidas de Difração de Raios X e ^1H -RMN para tentar obter informações moleculares que melhor esclarecem este processo de agregação. Ribeiro e col. em complexos AME: β CD também detectaram nanopartículas grandes (diâmetro médio de $> 500 \text{ nm}$), que diminuíam para $< 100 \text{ nm}$, em função do tempo (RIBEIRO *et al.*, 2010).

A.4 Difração de Raios X

Na análise realizada (figura 33), observamos que na mistura física existe uma sobreposição do difratograma da HP- β CD com o do antimoniato de meglumina, como esperado (já que na mistura física os compostos puros, AME e HP- β CD são pesados e misturados na forma de pó). Sobre o difratograma do complexo pode-se afirmar que:

1. O deslocamento em 2θ no primeiro pico sugere uma possível interação do antimoniato de meglumina com a HP- β CD.

2. A complexão é de não-inclusão do antimoniato de meglumina com a HP- β -CD, pois caso houvesse complexação de inclusão (inserção do AME na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina), o difratograma do complexo deveria ser semelhante ao da HP- β CD pura, que é amorfo.

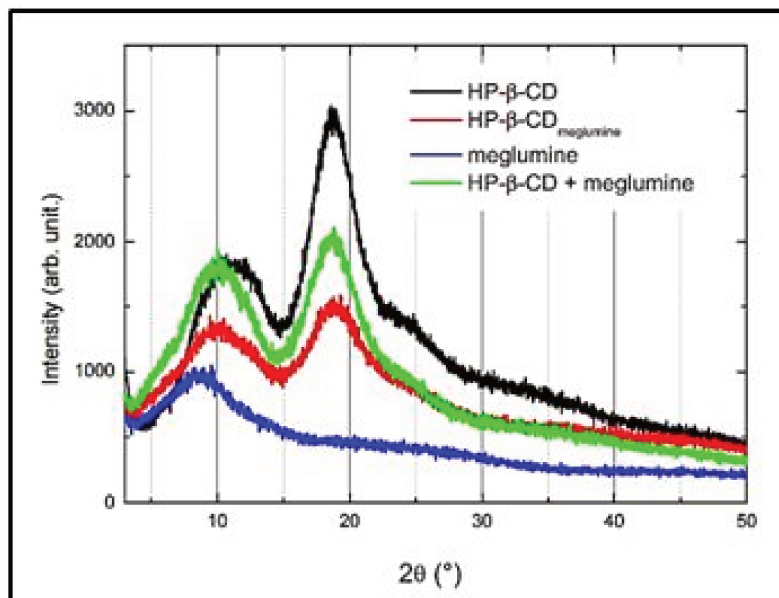


Figura 33 – Difratogramas de Raios-X da HP- β CD livre (linha preta), complexo AME:HP- β CD (linha vermelha), AME livre (azul), mistura física da HP- β CD e do AME (verde).

Embora as medidas de Raios X não permitam afirmar se houve ou não formação de agregados, os difratogramas da mistura física e do complexado mostraram intensidades diferentes, o que pode ser um indício de agregação.

A.5 Medidas de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ^1H -RMN foram coletados para as amostras em estudo (AME, HP- β CD e complexo AME: HP β CD). A figura 35 mostra os espectros do AME e somente do meglumina (metilglucamina, sem Sb como mostrado na estrutura química), ao lado direito dos espectros). Note-se que a molécula de meglumina tem 7 carbonos, sendo: 1 metila, 2 CH_2 e 4 grupos CH, compatíveis com os 6 picos identificados na figura 18B, considerando os hidrogênios magneticamente equivalentes na molécula. No entanto, o espectro registrado por nas medidas realizadas com o AME (figura 34A) é muito mais complexo, o que pode indicar degradação da amostra.

A figura 35 e a tabela 8 mostram o espectro e a atribuição dos picos da HP- β CD, os quais estão atribuídos em concordância com trabalhos anteriores de nosso laboratório (Franco

de Lima *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2005) e da literatura (Van Axel Castelli *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2009; TSAO *et al.*, 2011).

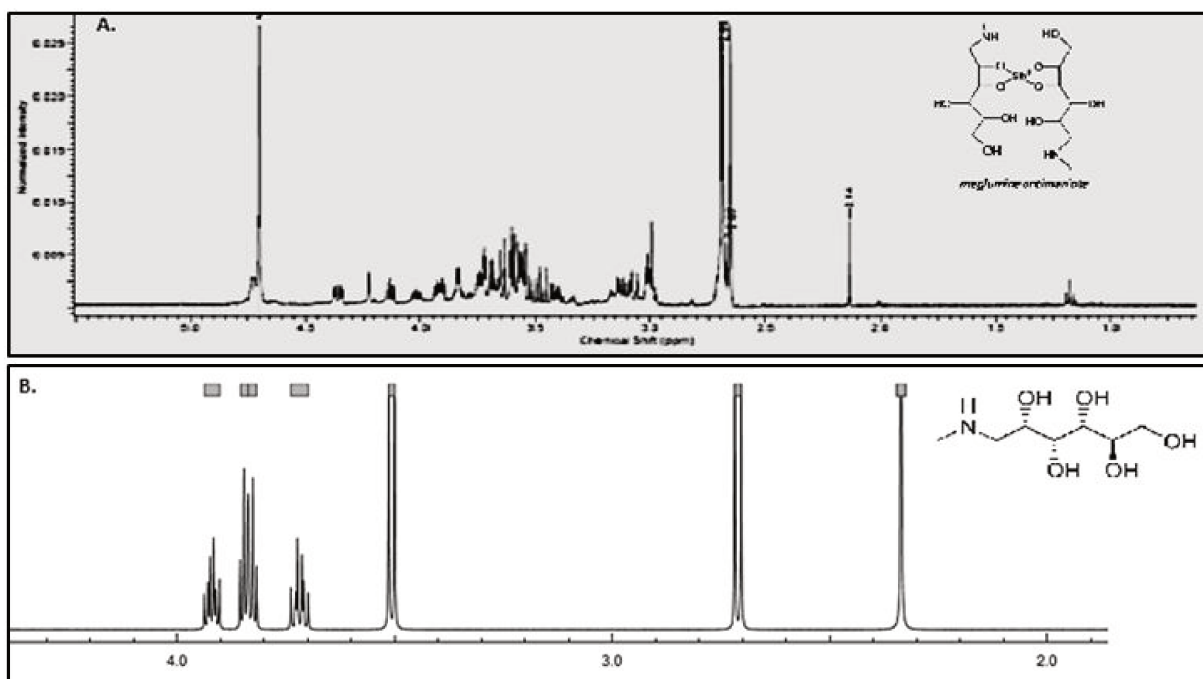


Figura 34 – Espectros de ^1H -RMN para AME (A) e meglumine (B, retirado da literatura) em 400,13 MHz, temperatura 25°C.

A figura 35B mostra o espectro do complexo AME:HP- β CD, porém os sinais do AME foram de difícil identificação. Foi realizada a análise de gradiente de campo magnética variável (DOSY) do AME e do complexo y os resultados são apresentados na (figura 36), os dados tratados permitiram o cálculo da constante de associação AME:HP- β CD, como mostrado na tabela 9. O coeficiente de difusão das moléculas pequenas como a água e a AME é grande e deve diminuir com a formação do complexo, já que a ciclodextrina apresenta mobilidade reduzida em solução, em comparação com a água. Esta menor difusão permite a determinação da fração da molécula hóspede associada ao anel macrocíclico e da constante de associação, por DOSY.

O valor da constante de associação, $K_a = 89,3 \text{ L/M}^{-1}$, determinado pela técnica de DOSY (tabela 9) é característico de associação fraca entre fármaco e ciclodextrina (LOUKAS *et al.*, 1998) e é compatível com a formação de complexos de não inclusão, mantidos por ligações de hidrogênio intermoleculares. É importante notar que o coeficiente de difusão do AME (3,12,10-10 m^2/s) é muito alto para uma molécula de sua massa molar e é compatível com a agregação do fármaco.

A formação de complexos de não inclusão já foi descrita para o antimoniatto de meglumina com a β CD pelo grupo de Frézard da Universidade Federal de Minas Gerais (DEMICHELI *et al.*, 2004; FRÉZARD *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2010) com efeitos farmacológicos interessantes e significativos (otimização da ação

Tabela 8 – Deslocamentos químicos ($\delta\Delta$ em ppm) e atribuição de hidrogênios para as amostra de HP- β CD (de acordo com a figura 36).

	Hidrogênio	Intervalo δ (ppm)
HP- β CD	CH_3 (hidroxi)	1,00-1,12
	H_4	3,47-3,59
	H_2	3,61-3,67
	H_5	3,74-3,84
	H_3	3,87
	H_1	4,96-5,08
	H_1	5,12-5,23

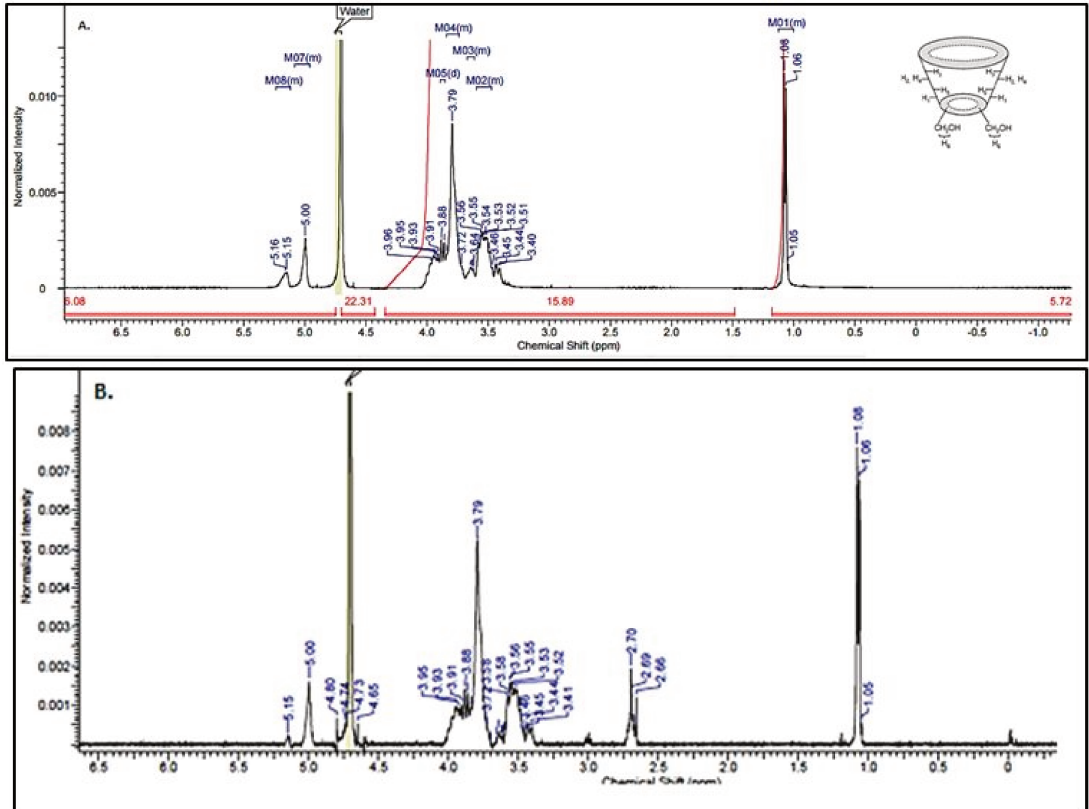


Figura 35 – Espectros de ^1H -RMN da HP- β CD (A) e do complexo AME:HP- β CD (B), medidos em 400,13 MHz, temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$.

farmacológica ou diminuição da toxicidade). Complexos de não inclusão já foram descritos para a riboflavina (JESUS *et al.*, 2012), e para outros fármacos, levando ao aumento da solubilidade, otimização de propriedades físico-químicas (DUAN *et al.*, 2005) e maior estabilidade química dos fármacos (HAZEKAMP; VERPOORTE, 2006).

Tabela 9 – Coeficientes de Difusão (D) do AME, HP- β CD, e do complexo AME:HP- β CD, fração molar do complexo e constante de associação (Kas) AME:HP- β CD.

Composto	D ($10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	Fração molar do complexo (%)	Ka (L/mol)*
AME	3,12	—	—
HP- β CD	2,03	—	—
HP- β CD:AME	2,85	25	89,3

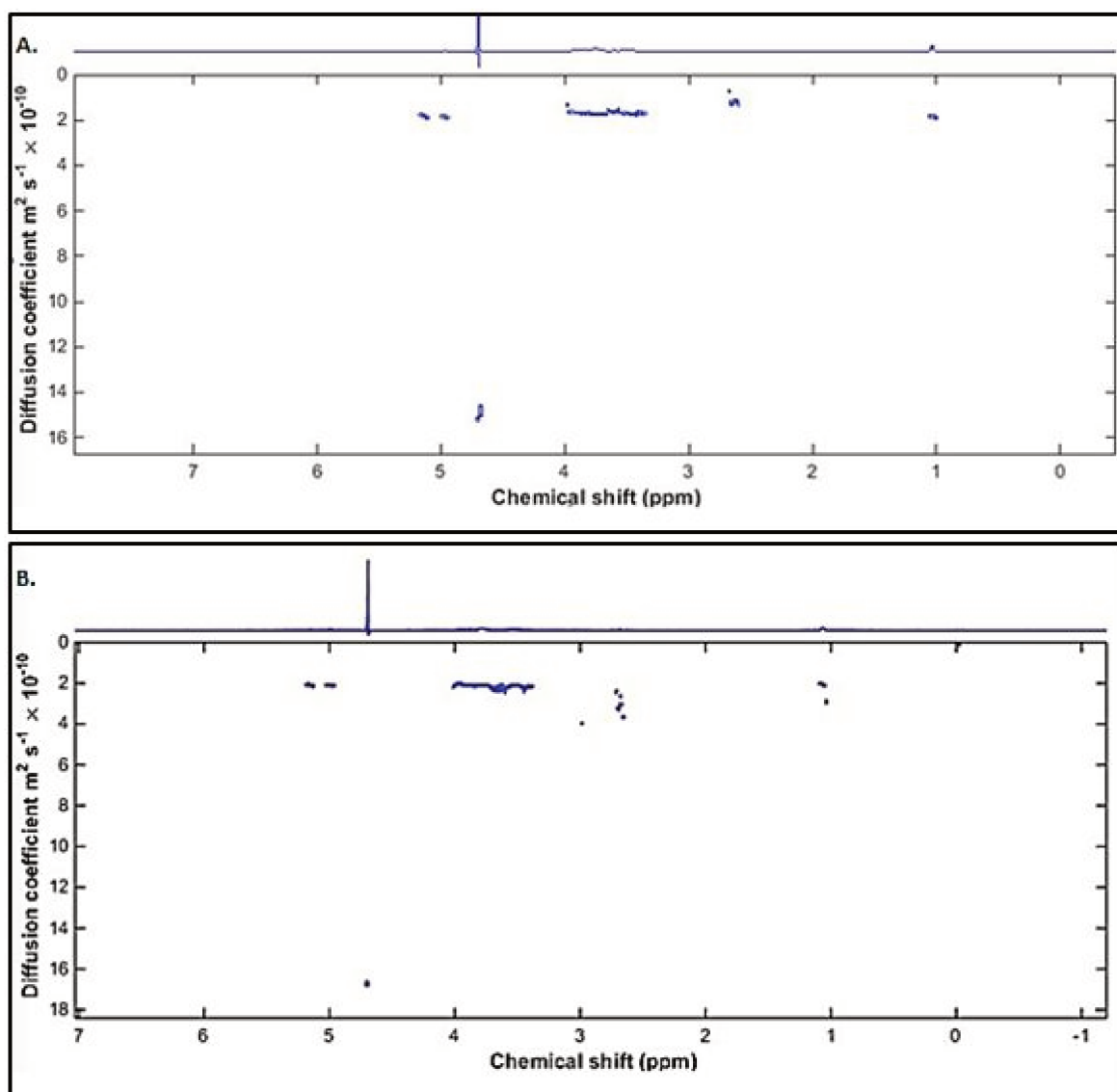


Figura 36 – Espectros DOSY de ^1H -RMN da HP- β CD (A) e do complexo AME:HP- β CD (B), medidos em 400,13 MHz, temperatura 25 °C

Devido ao processo de agregação do complexo ciclodextrina-AME, sendo encontrados tamanhos maiores ao definido para os lipossomas (400 nm), foi descartada a proposta inicial o uso da HP- β CD como carregadora do AME, e o estudo foi direcionado ao uso de lipossomas aniônicos, como sistema de carregamento para o fármaco.

A.6 Publicações relacionadas ao tratamento da Leishmaniose através do uso de antimoniato de meglumina (AME) encapsulado em lipossomas

A seguir se mostra um levantamento bibliográfico (em forma de tabela), relacionando ao tratamento da leishmaniose através do uso de antimoniato de meglumina (AME) encapsulado em lipossomas.

A tabela traz um levantamento detalhado dos artigos na literatura, envolvendo uso de antimoniais encapsulados em lipossomas no tratamento da leishmaniose. Os primeiros relatos ocorreram na década de 1980, quando diferentes autores verificaram, em modelos de roedores e no cão, que as formulações lipossomais foram até 700 vezes mais eficazes no tratamento da LV, quando comparadas ao tratamento convencional com os antimoniais não encapsulados (FRÉZARD; DEMICHELI, 2010). Usando SUV liofilizadas e depois reconstituídas (composição DSPC:Chol:DCP 5:4:1) por ressuspensão em tampão fosfato em pH 7,2, Schettini e col. conseguiram alcançar uma eficiência de encapsulação (% EE) de 38 % de AME em vesículas com tamanho médio de 2,37 μm e índice de polidispersão de 0,5 (SCHETTINI *et al.*, 2003). Formulações liposomais de três fármacos antileishmaniais: Glucantime, miltefosine e paromomicina foram preparadas por Momemi e col. usando um método modificado de emulsão/liofilização. A eficiência de encapsulação dos lipossomas preparados por esse método foi de até 90 %; porém os lipossomas tinham tamanho de distribuição bimodal, o que causou diminuição para 50 % de encapsulação durante a filtragem de esterilização. Estes autores mostraram também que o efeito da carga de superfície é significativo sobre o processo de preparação, o tamanho e a eficiência de encapsulação, apresentando maior eficiência de encapsulação e menor tamanho as formulações com carga negativa (-60.2mV) (MOMENI *et al.*, 2013). Borborema e col. desenvolveram formulações liposomais contendo AME e determinaram sua atividade leishmanicida e absorção em macrófagos, mostrando que o valor IC50 com o AME lipossomal foi 10 vezes menor que o do fármaco livre, apresentando ainda toxicidade reduzida nos macrófagos (BORBOREMA *et al.*, 2011). Usando AME encapsulado em lipossomas com fosfatidilserina, Tempone e col. demonstraram uma alta eficácia in vivo reduzindo em 133 vezes a dose de antimônio total administrada em hamsters infectados (TEMPONE; JR., 2008).

Ano	Tratamento(s)	Dose(s)	Tipo de lipossoma	Composição	Proporções	Resultados	Referência
1978	Infeção experimental <i>L.donovani</i> <i>In vivo</i> Hamsters Via administração: Via intravenosa e intracardiaca	0,3-1,3 mg Sb/kg 1,3-2,5 mg Sb/kg 2,5-5,2 mg Sb/kg 10-30 mg Sb/kg 40-80 mg Sb/kg Por 4 dias	MLV's Carregados positiva e negativamente dependendo do lipídio pH:7,3	DMPC/DCP/CHOL SM/CHOL/DCP SM/CHOL/SA Egg-PC/CHOL/DCP Egg-PC/CHOL/SA PS/CHOL DSPC/CHOL/DCP DSPC/CHOL/SA DMPC/CHOL/SA DMPC/CHOL	2:1,5:0,22 2:1,5:0,44 2:1,5:0,88	Lipossomas contendo egg-PC (carga positiva), são menos efetivos que os lipossomas carregados negativamente. Lipossomas contendo PS (carga negativa), foram os menos efetivos Lipossomas contendo fosfolípidios de cadeia longa altamente saturados (DPPC) , CHOL e uma carga negativa foram os mais efetivos. O rango de concentração 1,3-2,5 mg sb/kg de fármaco encapsulado teve resultado igual á concentração 823 mg sb/kg do fármaco livre, sendo 332-640 vezes maior na prevenção da mortalidade por leishmaniasis. Os lipossomas vazios apresentaram toxicidade nos camundongos.	1
1978	Infeção experimental <i>L.donovani</i> <i>In vivo</i> Hamsters Via administração: Intracardiaca	1 mg Sb/kg por 4 dias	MLV'S 2µm Carregados negativamente	DPPC/CHOL/DCP	2:1,5:0,22	A dose requerida para a supressão do 50% da infeção foi aproximadamente 350 vezes maior para o fármaco livre comparado com o fármaco encapsulado. O aumento do efecto anti-leishmania do fármaco encapsulado em lipossoma pode ser maior numa doença crónica, que numa infecção aguda. Aos 17 dias depois da infeção os animais tratados com o fármaco encapsulado apresentavam 61% de supressão do parasita, e o fármaco livre apresentava 18% de supressão só.	2
1980	Infeção experimental <i>L.donovani</i> <i>In vivo</i> Hamsters Via administração: Intracardiaca, parental, intravenosa, intramuscular	12-25 mg Sb/kg	MLV'S	DPPC/CHOL/DCP	-----	O fármaco encapsulado foi 276 vezes mais eficaz do que o antimoniató não encapsulado. As suspensões com o fármaco encapsulado e não encapsulado juntos, foram 8,5 vezes mais eficazes que a droga sozinha. 20/21 animais estiveram livres de parasitas 5 semanas depois da infecção. Os lipossomas vazios não apresentaram atividade leishmanicida.	3
1983	Infeção experimental <i>L.donovani</i> <i>In vivo</i> Hamsters Via administração: Intracardiaca	5µL /g (LAM)	MLV's pH 7,2	Segundo referência 1	Segundo referência 1	Encontraram-se interações dos lipossomas e parasitas com as células Kupffer. Os lipossomas que têm fosfolípidios saturados como o principal fosfolípido, como os preparados com palmitoil fosfatidilcolina ou esfingomielina são muito mais resistentes ao ataque enzimático por fosfolipases C ou A (encontradas no macrófago), quando são comparados com lipossomas feitos com lecitina de ovo. Os lipossomas com alta quantidade de fosfolípidios saturados foram mais efetivos contra a leishmaniose, comparados com os lipossomas feitos com fosfolípidios insaturados. Apresenta-se alteração na estrutura dos lipossomas, com a aparência malhada polimorfa no processo de degradação, no começo da liberação do fármaco.	4
1984	Infeção experimental <i>L.donovani</i> <i>In vivo</i> Hamsters Via administração: Intracardiaca	11-42 mg Sb/kg	MLV's pH:7,3	Segundo referência 1 e 2	Segundo referência 1 e 2	O fármaco encapsulado apresentou-se 100-120 vezes mais efetivo que o fármaco livre. A supressão da morte na infecção tipo II foi de 100% A supressão da morte na infecção tipo III foi de 80%	5
1984	Infeção experimental <i>L.donovani</i> <i>In vivo</i> Cachorros Via administração Intravenosa	0,5 mL/kg (LEMA) 1,94 mg Sb/kg (1 dia) 0,61 mg LEMA/kg (1-4 dias) 0,061 mg LEMA/kg (1 dia) 0,046 mg LEMA/kg (10 dias) 0,0152 LEMA/kg	MLV's pH:7,3	Segundo referência 1 e 2	Segundo referência 1 e 2	A maior porcentagem de inibição foi apresentada na concentração de 0,61 mg LEMA/kg, no tratamento de 4 dias consecutivos, com 97,4%, perto à porcentagem do fármaco livre 99,2% mais na concentração de 104 mg sb/kg por 10 dias. A dose SD ₅₀ de LEMA foi 0,029 mg sb/kg e esta mesma dose no fármaco livre esteve em 24 mg sb/kg. A dose 0,046 mg de LEMA/kg/dia teve uma baixa supressão do parasita, Isto indica que este nível de dosagem fica perto da dose mínima de drogas que pode ter eficácia quando entregues diretamente ao parasita.	6

1997	In vivo Cachorros Via administração: Intramuscular Subcutânea	25-85 mg Sb/mL	MLV's Pelo método High-Speed dispersion 250nm	S-PC/CHOL/DCP	31mM 15,5mM 3,3mM	A farmacocinética do meglumine antimonio encapsulado em lipossomas tem três fases: 1. Absorção 2. Decrecimento dos níveis do fármaco no plasma 3. Fase de eliminação A forma subcutânea tem uma lenta absorção e pouca vida meia. A forma intramuscular apresenta uma rápida absorção, altas concentrações do fármaco no plasma e chega rápido ao sistema sanguíneo.	7
2000	Infeção experimental <i>L.chagasi</i> In vivo Hamsters Via administração: Intraperitoneal	60 mg Sb/kg	MLV's, DRV's, SUV's FDEL's pH: 7,2	DCPC/CHOL/DCP	5:4:1 Proporção lipídio/ meglumine: 1:0,58	O método "DRV" é o mais eficiente para a encapsulação de antimonio de meglumina em lipossomas. Todos os animais tratados com Lglu mostrou menos de 70 amastigotas por 1000 núcleos da célula hospedeira no fígado ou no baço, e alguns animais (4 de 9) pareciam estar livre de parasitas Se sugere que um tratamento com 4 doses de 2 mg sb/kg por semana com antimonio de meglumina encapsulado em lipossomas puede ser satisfatório, uma vez que cada dose é 70 vezes menor que a dose acumulativa numa semana com o tratamento convencional.	8
2001	Infeção experimental <i>L.infantum</i> In vivo Cachorros Via administração: Subcutânea e intravenosa	9,8 µg/kg de Sb	_____	PC em emulsão de colato de sódio 10nm	_____	A concentração de Sb no plasma depois da administração intravenosa de LMA tem duas fases: 1, Rápida distribuição nos tecidos e decrescimento das concentrações de Sb no plasma 2, Fase mais lenta de diminuição do fármaco A concentração no plasma do fármaco depois da administração de LMA é sempre alta e se mantém ao longo de um período de tempo longo comparado com os níveis atingidos pelo fármaco livre.	9
2003	Infeção experimental <i>L.chagasi</i> In vivo Cachorros Via administração: intravenosa	3,8 mg sb /kg	FDEL's PH:7,2	L-α-DSPC/ CHOL/DCP	5:4:1	O tratamento com LMA apresentou altos níveis de Sb no fígado e baço por um longo período de tempo. O órgão crítico para o tratamento com LMA foi a medula óssea, encontrando-se nela baixos níveis de Sb. Uma única dose de LMA não foi suficiente para a eliminação total dos parasitas da medula óssea.	10
2004	Infeção experimental <i>L.chagasi</i> In vitro macrófagos	342,17-0,47µM	SUV's Carregados negativamente Radio-marcados com 30µCi de [³ H] DPPC	Egg-PC/PS/CHOL	5:1:4 4:4:2	A formulação não apresentou toxicidade nos macrófagos peritoneais A quantidade de fármaco livre utilizado no tratamento foi 16 vezes maior que o fármaco encapsulado. A IC ₅₀ para o antimonio liposomal foi 14,11µM conseguindo a eliminação completa da carga parasitaria nos macrófagos. Melhorou-se o direcionamento dos lipossomas para os macrófagos infectados através de interação com o receptor SRs.	11
2005	Infeção experimental <i>L.chagasi</i> In vivo Cachorros Via administração: Intravenosa	6,5 mg sb/kg Por 4 dias	FDEL's pH: 7,2 1,2µm	Lα-DSPC/ CHOL/DCP	5:4:1	O tratamento diminuiu significativamente o numero de cachorros positivos para parasitas com menos de 1 amastigota por 1000 células hospede mas não se logro a eliminação total dos parasitas Foram atingidos baixos níveis de antimonio de meglumina na medula óssea devido ao maior tamanho dos lipossomas usados (1,2 µm) e se acredita que este órgão é mais acessível a lipossomas de menor tamanho.	12
2006	Infeção natural <i>L.chagasi</i> In vivo Cachorros Via administração: Intravenosa	5,7 mg sb/kg 100 mg sb/kg 4,2mg sb/kg	FDEL's Misturados com solução de sacarose 3:1 pH:7,4 400 nm	DSPC/ CHOL/DCP	5:4:1	Os lipossomas com tamanho maior de 1µm apresentam problemas para sua aplicação intravenosa. O uso de açúcares crioprotectoras controla a fusão da membrana durante a liofilização obtendo lipossomas de tamanho menor com altas eficiencias de encapsulação. A cinética de libertação do fármaco foi bifásica, com uma primeira fase de libertação rápida da droga, seguida por uma segunda fase de libertação prolongada. A quantidade e taxa de libertação do fármaco durante a primeira fase foi encontrada significativamente mais elevado para a formulação preparada com sacarose, quando comparado com a preparada sem açúcar. Assim, a presença de sacarose provoca maior libertação de antimonio a partir de lipossomas e uma alta retenção nos tecidos. E melhor direcionamento aos órgãos. Mesmo a uma dose 23 vezes menor de antimonio, a formulação lipossomal resultou em níveis de antimonio, de duas vezes, 63 vezes e 68 - vezes maior na medula óssea, fígado e baço, respectivamente, quando comparado com o fármaco livre.	13

2008	Infeção natural <i>L.chagasi</i> In vivo Cachorros Via administração: Intravenosa	6,5 mg sb/kg Por 4 dias 4,2 mg sb/kg	FDEL's Misturados com solução de sacarose 3:1 pH:7,2	DSPC/ CHOL/DCP	5:4:1	A dose acumulativa por antimonio de meglumina lipossomal foi 20 vezes menor comparada na dose acumulativa atingida no tratamento convencional. Os sintomas da doença depois do tratamento diminuíram significativamente. Encontraram-se signos adversos depois dos primeiros 15 minutos da aplicação do tratamento. Mais do que uma redução de 95,7% da carga de parasita foi conseguida nos nós do fígado, do baço, e nódulos linfáticos cervical após o tratamento com fármaco encapsulado em lipossomas, em comparação com o tratamento quer com lipossomas vazios ou solução salina.	14
2008	Infeção experimental <i>L.chagasi</i> In vivo Hamsters Via administração: Intraperitoneal	0,75-75 mg sb/kg	SUV's 20 nm Carregados negativamente	Egg-PC/PS/CHOL	5:1:4	Redução do 100% dos amastigotas no fígado na dose de 0,75 mg/kg. Não se apresentou cito-toxicidade. Eficácia da formulação lipossomal 16 vezes maior comparado com o fármaco livre. Com lipossomas de carga neutra se encontrou um efeito antiparasitário da formulação lipídica.	15
2011	Infeção experimental <i>L.major</i> In vitro macrófagos	10,4 mg/mL	SUV's Fluorescentes Marcados com DIL-L ou DIL-PS-L pH:7,4	PC/CHOL/D-L- α tocoferol PC/PS/CHOL/D-L- α tocoferol	10:4:0,1 10:1:4:0,1	O antimonio de meglumina lipossomal foi 5 vezes mais efetiva, com uma toxicidade reduzida em macrófagos. A concentração requerida para matar o 100% dos amastigotas intracelulares foi 40 vezes menor nas formulações lipossomais de antimonio contendo PS comparado com o fármaco livre. A IC50 nos lipossomas PC/CHOL/D-L- α tocoferol foi 10,5 μ M. Os lipossomas contendo PS tiveram atividade leishmanicida 100% de morte de todos os amastigotas numa concentração de 25 μ M.	16
2013	Infeção experimental <i>L.major</i> In vivo BALB/c Via administração: Subcutânea	25-200 μ g/mL	SUV's Técnica modificada Freeze-drying double emulsion (FDE) Misturados com solução de sacarose 101 $\pm$ 23nm	PC/PE/CHOL/PG	-----	O tamanho da leção diminuiu significativamente comparado com os grupos controle. A contagem de amastigotas nas lesões da pele diminuiu em todos os grupos tratados com a formulação lipossomal. A eficiência de encapsulação de lipossomas foi de até 90%; no entanto, eles herdaram uma distribuição de tamanho bimodal causando que sua eficiência de encapsulação fora reduzida a 50% durante a filtração esterilização.	17
2014	Infeção experimental <i>L.infantum</i> Via administração: Intraperitoneal	30 mg sb/kg	FDEL's Misturados com solução de sacarose 3:1 400nm pH 7,2	DSPC/CHOL/DCP	5:4:1	Tratamento com LMA diminuiu o 41% da carga parasitaria no fígado e baço junto com um menor dano no órgão. O tratamento por via oral com WEP associado com uma única dose de MA lipossomal reduziu a carga parasitária tanto no fígado e no baço, no mesmo nível observado com o tratamento com AM lipossomal (40 e 30%, respectivamente).	18

Abreviaturas:

DMPC: Dimiristoil- dipalmitoil
DCP: Dicetil-fosfato
CHOL: Colesterol
SM: Esfingomielina
SA: Esterilamina
Egg-PC: Fosfatidilcolina de ovo
PS: Fosfatidilserina
DSPC: Distearoil- fosfatidilcolina
DPPC: Dipalmitoil-fosfatidilcolina
S-PC: Fosfatidilcolina de soja

PC: Fosfatidilcolina
L- α -DSPC: L- α Distearoil- fosfatidilcolina
PE: Fosfatidil-etanolamina
PG: Fosfatidil-glicerol

Referências:

1. Alving, C. R., Steck, E. A., Chapman Jr, W. L., Waits, V. B., Swartz Jr, G. M., & Hanson, W. L. (1978). Therapy of leishmaniasis: Superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(6), 2959-2963.
2. Alving, C. R., Steck, E. A., Hanson, W. L., Loizeaux, P. S., Chapman Jr, W. L., & Waits, V. B. (1978). Improved therapy of experimental leishmaniasis by use of a liposome-encapsulated antimonial drug. *Life Sciences*, 22, 1021-1026.
3. Alving, C. R., Chapman, W. L., Chapman Jr, W. L., Waits, V. B., Hendricks, L. D., Swartz, G. M., et al. (1980). Liposomes in leishmaniasis: therapeutic effects of antimonial drugs, 8-aminoquinolines, and tetracycline. *Life Sciences*, 26, 2231-2238.
4. Weldon, J. S., Munnell, J. F., Hanson, W. L., & Alving, C. R. (1983). Liposomal Chemotherapy in Visceral Leishmaniasis :An Ultrastructural Study of an Intracellular Pathway. *Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research*, 69, 415-424.
5. Alving, C. R., Swartz Jr, G. M., & Hendricks, L. D. (1984). Liposomes in leishmaniasis: effects of parasite virulence on treatment of experimental leishmaniasis in hamsters. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 78(3), 279-286.
6. Chapman Jr, W. L., Hanson, W. L., Alving, C. R., & Hendricks, L. D. (1984). Antileishmanial activity of liposome-encapsulated meglumine antimoniate in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, 45(5), 1028-1030.
7. Valladares, J. E., Freixas, J., Alberola, J., Franquelo, C., Cristofol, C., & Arboix, M. (1997). Pharmacokinetics of liposome-encapsulated meglumine antimoniate after intramuscular and subcutaneous administration in dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57(4), 403-406.
8. Frézard, F., Michalick, M. M., Soares, C. F., & Demicheli, C. (2000). Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 841-846.
9. Valladares, J. E., Cristina, R., González-Ensenyat, P., Díez-Cascón, A., Ramos, G., Solano-Gallego, L., et al. (2001). Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation. *Veterinary Parasitology*, 97, 15-21.
10. Schettini, D. A., Costa Val, A. P., Souza, L. F., Demicheli, C., Rocha, O. F., Michalick, M. M., et al. (2003). Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 269-272.

11. Tempone, A. G., Perez, D., Rath, S., Vilarinho, A. L., Mortara, R. A., & de Andrade Jr, H. F. (2004). Targeting Leishmania (L.) chagasi amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 60–68.
12. Schettini, D. A., Costa Val, A. P., Souza, L. F., Demicheli, C., Rocha, O. F., Melo, M. N., et al. (2005). Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1879-1883.
13. Schettini, D. A., Ribeiro, R. R., Demicheli, C., Rocha, O. F., Melo, M. N., Michalick, M. M., et al. (2006). Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *International Journal of Pharmaceutics*, 315, 140-147.
14. Ribeiro, R. R., Moura, E. P., Pimentel, V. M., Sampaio, W. M., Silva, S. M., Schettini, D. A., et al. (2008). Reduced Tissue Parasitic Load and Infectivity to Sand Flies in Dogs Naturally Infected by Leishmania (Leishmania) chagasi following Treatment with a Liposome Formulation of Meglumine Antimoniate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), 2564–2572.
15. Tempone, A. G., & de Andrade Jr, H. F. (2008). Nanoformulations of pentavalent antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes demonstrate highest efficacy against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 67(2), 131-136.
16. Borborema, S. T., Schwendener, R. A., Junior, J. A., de Andrade Junior, H. F., & do Nascimento, N. (2011). Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in Leishmania (Leishmania) major-infected macrophages. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 341– 347.
17. Momeni, A., Rasoolian, M., Momeni, A., Navaei, A., Emami, S., Shaker, Z., et al. (2013). Development of liposomes loaded with anti-leishmanial drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Liposome Research*, 23(2), 134–144.
18. Ferreira, F. M., Castro, R. O., Batista, M. A., Rossi, F. O., Silveira-Lemos, D., Frézard, F., et al. (2014). Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, 113, 533–543.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "***Desenvolvimento de um sistema de liberação sustentada de antimoníato de meglumina em lipossomas e avaliação de sua atividade em macrófagos DH82 infectados com Leishmania infantum***", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: _____

Nome do(a) aluno(a): Vicky Vanessa Ortega Gaona

Assinatura: _____

Nome do(a) orientador(a): Eneida de Paula

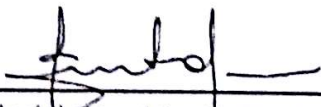
Data: 28/07/2016

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Desenvolvimento de um sistema de liberação sustentada de antimoniato de meglumina em lipossomas e avaliação de sua atividade em macrófagos DH82 infectados com Leishmania Infantum**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 25/07/2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **VICKY VANESSA ORTEGA GAONA**
RG n.º V960117-2

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Eneida de Paula**
RG n.º