Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Cipharma

Avaliação da atividade de nanocápsulas com diferentes características superficiais sobre a resposta imune de células J774.A1 e sobre a infecção por *Leishmania infantum*

Juliana Rezende Borges

Ouro Preto - Minas Gerais - Brasil
Maio de 2012.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Reitor

João Luiz Martins

Vice-Reitor

Antenor Barbosa Junior

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CIPHARMA

Coordenadora

Profa. Dr[a.] Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Avaliação da atividade de nanocápsulas com diferentes características superficiais sobre a resposta imune de células J774.A1 e sobre a infecção por *Leishmania infantum*

Juliana Rezende Borges

Orientadora: Profa. Dr[a]. Simone Aparecida Rezende

Co-orientadora: Profa. Dr[a]. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ouro Preto - Minas Gerais - Brasil

Maio de 2012.

B732a Borges, Juliana Rezende.

Avaliação da atividade de nanocápsulas com diferentes características superficiais sobre a resposta imune de células J774.A1 e sobre a infecção por *Leishmania infantum* [manuscrito] / Juliana Rezende Borges – 2012.

xv, 98 f.: il. color.; grafs., tabs.

Orientadora: Profª Drª Simone Aparecida Rezende.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

1. Nanotecnologia - Teses. 2. Imunologia - Teses. 3. Células J774 - Teses. 4. Resposta imune - Teses. 5. *Leishmania infantum* - Teses.

I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 615.014.6:616.993.161

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

Sessão de defesa da 61ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a JULIANA REZENDE BORGES com a defesa da dissertação intitulada: "Avaliação da atividade de nanocápsulas com diferentes características superficiais sobre a resposta imune de células J774.A1 e sobre a infecção por *Leishmania infantum*", avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 31 de maio de 2012.

Prof. Dr. Gilson Andrade Ramaldes
UFMG

Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva
DECBI/UFOP

Profª. Drª. Simone Aparecida Rezende
DEACL/UFOP

Rua Costa Sena, 171 – Centro – 35400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Homepage: http://www.ufop.br – E-mail: diretor@ef.ufop.br – Fone: (0xx31) 3559-1626 – Fax: (0xx31) 3559-1628

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais e irmãos, pelo amor e apoio que sempre me foi dado ao longo de toda minha vida, e ao Willian por ter sido meu ouvinte, amigo e companheiro.

As pessoas sempre culpam as circunstâncias por aquilo que acontece com elas.

Não acredito em circunstâncias.

As pessoas que progridem na vida são aquelas que acordam pela manhã e procuram as circunstâncias que desejam, e se não as encontram, as criam.

Jorge Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, por guiar meus passos e iluminar meus caminhos.

À minha Nossa Senhora da Aparecida por me fortalecer nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos pais Cirineu Mateus Borges e Ivone Luiza Rezende Borges por todo o amor, dedicação e incentivo. Por acreditarem sempre em mim e por possibilitarem a realização de meus sonhos.

Aos meus irmãos Letícia e Cirineu Jr. por todo carinho e apoio.

Aos meus sobrinhos Lucas e Iara por me trazerem alegria de viver.

Ao Willian pelo amor e paciência...por ter sido meu grande companheiro e conselheiro em todos os momentos.

À querida amiga Leidiane, companheira de mestrado, pela ajuda nos experimentos que conduziram este trabalho, por ter compartilhado comigo os instantes felizes e tristes que vivenciei ao longo desses dois anos... Por ter me ajudado de todas as formas... Obrigada pela amizade!

À minha orientadora professora Simone Aparecida Rezende, pela oportunidade de trabalhar com a pesquisa e abrir as portas para o conhecimento da Imunologia.

À professora Vanessa Carla Furtado Mosqueira pela co-orientação e importante contribuição nesse trabalho.

Ao professor Luiz Carlos Crocco Afonso, por abrir as portas do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP), pela grande colaboração científica para o direcionamento deste trabalho e pelo exemplo de profissional.

Ao professor Laser Oliveira e à Líliam Teixeira pela colaboração e por terem enriquecido esse trabalho através de seus conhecimentos.

Aos amigos Letícia, Maurício, Renata, Jaime e Bijay por tornarem meus dias de laboratório mais acolhedores, mais felizes e engraçados!

À amiga Gabi pelo carinho, pelas conversas e pelas risadas...

À amiga Ana Paula, por ter me acolhido em sua casa no início dessa jornada e por toda a amizade!

Aos colegas dos Laboratórios de Imunoparasitologia e Nanobiotecnologia que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático de uma nanocápsula 3

Figura 2. Etapas de preparação de nanocápsulas 17

Figura 3. Esquema resumido do ensaio de viabilidade celular 18

Figura 4. Representação esquemática da estrutura de constituição das diferentes nanocápsulas. 25

Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a viabilidade de células J774.A1 27

Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a viabilidade de células J774.A1 28

Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a viabilidade de células J774.A1 29

Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de quitosana pura sobre a viabilidade de células J774.A1 30

Figura 9. Viabilidade de células J774.A1 na presença de concentrações menores de nanocápsulas de PLA-QUI 31

Figura 10. Efeito das diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a produção de NO por macrófagos estimulados com LPS/IFN-γ 32

Figura 11. Efeito das diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de NO por macrófagos estimulados com LPS/IFN-γ. 33

Figura 12. Efeito das diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de NO por macrófagos estimulados com LPS/IFN-γ. 34

Figura 13. Efeito de nanocápsulas de PLA sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. 35

Figura 14. Efeito da nanocápsulas de PLA sobre a produção de TNF-α por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. 36

Figura 15. Efeito da nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. 37

Figura 16. Efeito da nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de TNF-α por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. 38

Figura 17. Efeito da nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. 39

Figura 18. Efeito da nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de TNF-α por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. 40

Figura 19. Imagem de microscopia confocal de células J774.A1 cultivadas na ausência de nanocápsulas. 41

Figura 20. Imagem de microscopia confocal de células J774.A1 incubadas com nanocápsulas de PLA contendo o marcador fluorescente AlClPC encapsulado, na ausência de soro de camundongos BALB/c. 42

Figura 21. Imagens de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com soro fresco de camundongos BALB/c e nanocápsulas de PLA (250 µg/mL) contendo o marcador fluorescente AlClPC encapsulado. 42

Figura 22. Imagem de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com nanocápsulas de PLA-PEG (1000 µg/mL), contendo o marcador fluorescente AlClPC encapsulado, na ausência de soro de camundongos BALB/c. 43

Figura 23. Imagem de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com soro fresco de camundongos BALB/c e nanocápsulas de PLA-PEG (250 µg/mL) contendo o marcador fluorescente AlClPC encapsulado. 44

Figura 24. Imagem de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com nanocápsulas de PLA-QUI (10 µg/mL), contendo o marcador fluorescente AlClPC encapsulado, na ausência de soro de camundongos BALB/c. 45

Figura 25. Imagem de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com soro fresco de camundongos BALB/c e nanocápsulas de PLA-QUI (5 µg/mL) contendo o marcador fluorescente AlClPC encapsulado. 45

Figura 26. Histograma de quantificação da internalização das nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-CHI pelas células J774.A1 46

Figura 27. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a produção de NO. 48

Figura 28. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de NO. 49

Figura 29. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de NO. 50

Figura 30. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a produção de IL-10.. 51

Figura 31. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a produção de TNF-α.. 52

Figura 32. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de IL-10. 53

Figura 33. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de TNF-α. 54

Figura 34. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de IL-10. 55

Figura 35. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de TNF-α. 56

Figura 36. Efeito das nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI sobre a porcentagem de macrófagos J774.A1 infectados por *Leishmania infantum* (A) e sobre o número de amastigotas por macrófago (B). 57

Figura 37. Efeito das nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI na presença de soro fresco de BALB/c sobre a porcentagem de macrófagos J774.A1 infectados por *Leishmania infantum* (A) e sobre o número de amastigotas por macrófago (B) 58

Figura 38. Efeito da nanocápsulas de PLA sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com *Leishmania infantum*. 59

Figura 39. Efeito da nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com *Leishmania infantum*. 60

Figura 40. Efeito da nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com *Leishmania infantum*. 61

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Determinação do tamanho e índice de polidispersão de nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI 26

LISTA DE ABREVIATURAS

AlClPC	Ftalocianina de cloro e alumínio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
NC	Nanocápsulas
NF-κB	Fator transcripcional NF-κB
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PLA	Polímero de ácido poli lático
PEG	Polímero de polietilenoglicol
QUI	Quitosana
SDS	Lauril sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

RESUMO

As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que a substância é confinada em uma cavidade preenchida com óleo ou emulsão e rodeada por uma membrana polimérica única. A influência da modificação da solubilidade, tamanho, composição química e característica superficial de nanocápsulas sobre a sua biocompatibilidade e biodistribuição no organismo já é bem conhecida. No entanto, o efeito dessas propriedades sobre o sistema imunológico ainda foi pouco explorado. Diante disso, este estudo objetivou avaliar o efeito de nanocápsulas com diferentes características superficiais (nanocápsulas poliméricas derivadas do ácido lático - PLA, nanocápsulas de PLA revestida com polietilenoglicol - PLA-PEG e nanocápsulas de PLA revestida com quitosana - PLA-QUI) sobre a resposta imune de células J774.A1 e sobre a infecção por *Leishmania infantum*. Os resultados obtidos demonstraram que essas nanocápsulas apresentam atividade moduladora sobre a produção de NO, TNF-α e IL-10. Na presença do soro fresco de camundongos BALB/c, essa atividade pôde ser observada em concentrações mais baixas das nanocápsulas. Além disso, os experimentos de pré-tratamento das células J774.A1 com as nanocápsulas mostraram que essas apresentaram a capacidade de promover alteração na resposta imune das células J774.A1 frente a um determinado estímulo. A análise por microscopia confocal mostrou que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG foram internalizadas pelas células J774.A1, tanto na presença como na ausência de soro. Essas nanocápsulas induziram aumento significativo da produção de IL-10 com consequente diminuição na produção de TNF-α e NO. A quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou que as nanocápsulas de PLA foram mais internalizadas pelas células J774.A1 do que as nanocápsulas de PLA-PEG e PLA-QUI. A avaliação do efeito *in vitro* das nanocápsulas de PLA, PLA-PEG sobre a resposta imune de células J774.A1 infectadas com *Leishmania infantum* demonstrou que essas promoveram aumento na produção de IL-10 o que favoreceu a infecção causada pelo parasito. Considerando esses resultados, observa-se que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG atuam sobre as células J774.A1 de forma a promover a ativação de uma resposta anti-inflamátória. Ao contrário do que foi observado para as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG, as nanocápsulas de PLA-QUI induziram diminuição na produção de IL-10 e aumento na produção de TNF-α e NO, ativando dessa forma uma resposta inflamatória. No entanto, essas nanocápsulas não tiveram efeito sobre a resposta imune de células J774.A1 infectadas com *L. infantum*. Através de seu efeito imunomodulador, as nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI podem ser utilizadas para atuar em sinergismo com determinadas drogas, podendo assim aumentar a eficiência de tratamento para muitas doenças.

Palavras - chave: Nanocápsulas, características superficiais, células J774, resposta imune e *Leishmania infantum.*

ABSTRACT

Nanocapsules are composed by a polymeric wall and surfactants surrounding an oily core in which lipophilic substances can be associated. The importance of modification of the solubility, size, chemical composition and surface characteristics of nanocapsules on their biocompatibility and biodistribution in the body is well known. Nevertheless, the effect of these properties on the immune system has been poorly explored. Thus, this study aimed to evaluate the effect of nanocapsules with different surface characteristics, on the immune response of J774.A1 macrophage cell line and on infection by *Leishmania infantum.* The results showed that these nanocapsules modulate the production of NO, TNF-α and IL-10 by J774.A1 cells. In the presence of fresh mice serum, this activity could be observed at lower polymeric concentrations. Analysis by confocal microscopy showed that PLA and PLA-PEG nanocapsules were internalized by J774.A1 cells in the presence and absence of fresh mice serum. These nanocapsules induced significant increase of IL-10 with consequent decrease on NO and TNF-α production by the cells. The quantification by high performance liquid chromatography (HPLC) showed that PLA nanocapsules were more internalized than PLA-PEG and PLA-CHI nanocapsules. The *in vitro* evaluation of the effect of PLA and PLA-PEG nanocapsules on the immune response of J774.A1 cells infected with *L. infantum* demonstrated that these nanocapsules promoted an increase on IL-10, favoring the infection by the parasite. Considering these results, it was observed that PLA and PLA-PEG nanocapsules act on J774.A1 cells in order to promote an anti-inflammatory response. In contrast, the PLA-CHI nanocapsules increased the production of TNF-α, NO and decreased the production of IL-10, activating a pro-inflammatory response. However, the PLA-CHI nanocapsules had no effect on the immune response of J774.A1 cells infected with *L. infantum*. Through their immunomodulatory effect, PLA, PLA-PEG and PLA-CHI nanocapsules can be used to act in synergy with certain drugs and can thus increase the efficiency of treatment for many diseases.

Keywords: nanocapsules; surface properties; immune response; *Leishmania infantum*

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA VI

LISTA DE FIGURAS IX

LISTA DE TABELA XII

LISTA DE ABREVIATURAS XIII

ABSTRACT XV

SUMÁRIO XVI

1. INTRODUÇÃO 2

1.1. Aspectos gerais da nanotecnologia 2

1.2. Inflamação e imunomodulação 7

1.3. Leishmaniose Visceral 9

2. OBJETIVOS 13

2.1. OBJETIVO GERAL 13

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13

3. MATERIAL E MÉTODOS 15

3.1. Cultura de células 15

3.2. Animais 15

3.3. Preparo das Nanocápsulas 15

3.4. Determinação da viabilidade celular 17

3.5. Efeito das nanocápsulas sobre a produção de óxido nítrico 18

3.6. Determinação da produção de TNF-α e IL-10 19

3.7. Avaliação da internalização das nanocápsulas pelas células J774.A1 20

3.7.1. Análise por microscopia confocal 20

3.7.2. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 21

3.8. Efeito das nanocápsulas sobre células J774.A1 infectadas com *Leishmania infantum* 22

3.8.1. Cultura de *Leishmania* 22

3.8.2. Infecção Experimental 22

3.9. Análise estatística 23

4. RESULTADOS 25

4.1. Preparo das nanocápsulas 25

4.2. Determinação da viabilidade celular 26

4.3. Efeito das nanocápsulas sobre a produção de óxido nítrico 31

4.4. Determinação da produção de TNF-α e IL-10 34

4.5. Avaliação da internalização das nanocápsulas pelas células J774.A1 40

4.5.1. Análise por microscopia confocal 40

4.5.2. Análise quantitativa 46

4.6. Avaliação do efeito do pré-tratamento com as nanocápsulas sobre a produção de NO 47

4.7. Avaliação do efeito do pré-tratamento com as nanocápsulas sobre a produção das citocinas IL-10 e TNF-α 50

4.8. Avaliação do efeito das nanocápsulas sobre a carga parasitária de macrófagos J774.A1 infectados com *L. infantum* 56

4.9. Avaliação do efeito das nanocápsulas sobre a produção de NO e de citocinas (IL-10 e TNF-α) por macrófagos J774.A1 infectados com *L. infantum* 58

5. DISCUSSÃO 63

6. CONCLUSÃO 71

7. REFERÊNCIAS 73

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da nanotecnologia

A nanotecnologia é o ramo da ciência responsável pelo desenvolvimento e pesquisa de estruturas e materiais manipulados em escala nanométrica. Um nanômetro (nm) corresponde à bilionésima parte do metro ($1x10^{-9}$ m) e as estruturas produzidas em escala, que varia em geral de 1 a 200 nm, acabam assumindo novas propriedades físicas, mecânicas, elétricas, químicas e biológicas (Melo *et al.,* 2004; Scheu *et al.,* 2006). Um dos principais fatores que faz com que os nanomateriais sejam significativamente diferentes de outros materiais é o aumento relativo da superfície de contato. Dessa forma, o fato de inúmeras reações químicas poderem ocorrer na superfície das partículas sugere que uma dada massa de material nanoparticulado será muito mais reativa que a mesma massa de material feito com partículas grandes (Pison *et al.,* 2006). Assim, o interesse pela nanotecnologia vem crescendo rapidamente, principalmente com relação a sua aplicação na vetorização de fármacos.

A vetorização de fármacos, baseada na teoria de Paul Ehrlich sobre a capacidade de minúsculas partículas em carrear moléculas ativas aos sítios específicos de ação, tem sido considerada uma das principais linhas da pesquisa biofarmacêutica das últimas décadas, fazendo parte de uma grande área que rapidamente emergiu no Brasil e no mundo. A utilização de sistemas coloidais nanoestruturados constitui uma alternativa que visa alterar a biodistribuição de fármacos após sua administração por diferentes vias (Banker *et al.,* 1996).

O sistema de liberação vetorizado, além de carrear o fármaco seletivamente até seu sítio de ação, previne a degradação ou inativação do fármaco durante o seu trânsito e protege o corpo de reações adversas devido à distribuição inapropriada do fármaco (Banker *et al.,* 1996).

Dentre os sistemas vetorizados, as nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis têm atraído muita atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas, à capacidade de promover uma liberação controlada dependente da degradação de sua matriz polimérica e à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (Soppimath *et al,* 2001; Schaffazick *et al.,* 2003). Além disso, as nanopartículas poliméricas apresentam uma preparação rápida, fácil e de baixo custo quando comparadas com outros sistemas vetorizados (Hans *et al.,* 2002).

O termo nanopartículas aplicado na vetorização de fármacos refere-se a diferentes tipos de estruturas, sendo uma delas denominada de nanocápsulas. As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que a substância é confinada em uma cavidade preenchida com óleo ou emulsão e rodeada por uma membrana polimérica única (Quintanar *et al.*, 1998, Soppimath *et al.*, 2001,) (Figura 1).

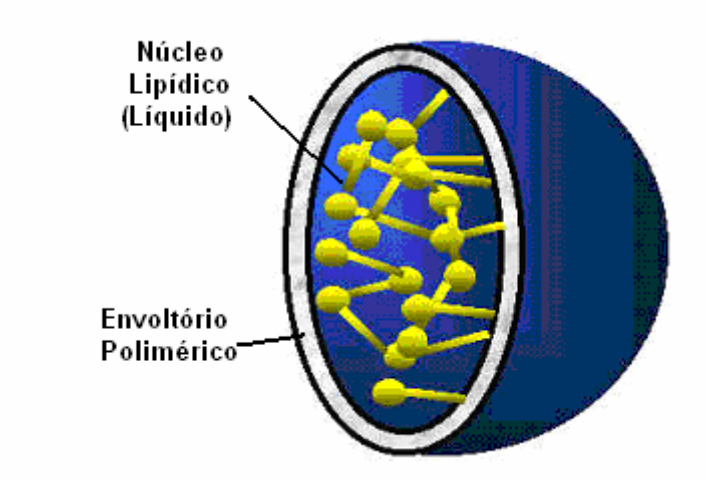

Figura 1. Desenho esquemático de uma nanocápsula representando o envoltório polimérico envolvendo o núcleo oleoso. (adaptado de www.library.thinkquest.org/NC.html).

As nanocápsulas são tecnicamente atraentes para a administração intravenosa de substâncias, pois são constituídas por polímeros estáveis e biodegradáveis. Devido à sua cavidade central oleosa, as nanocapsulas permitem altos rendimentos de encapsulação de substâncias lipofílicas (Quintanar *et al.*, 1998). Além disso, as nanocápsulas possibilitam seu direcionamento e manutenção em sítios específicos do organismo através da modificação de suas características superficiais. Essas modificações podem facilitar a entrega e a liberação controlada de agentes terapêuticos nos seus sítios de ação. Dessa forma, é possível promover um melhor controle sobre a farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade, imunogenicidade e bioreconhecimento desses nanossistemas, com o objetivo de melhorar a eficácia dos agentes terapêuticos carreados (Pison *et al.*, 2006).

A escolha do polímero é um dos fatores mais importantes no preparo das nanocápsulas. Dentre os polímeros mais utilizados, destacam-se os poliésteres aprovados pela agência de vigilância sanitária americana (*Food and Drug Administration* -FDA), tais como derivados do ácido lático (PLA), do ácido glicólico (PGA), polietilenoglicol (PEG), derivados da caprolactona (PCL) e, especialmente, os copolímeros de ácido lático e glicólico (PLGA) (Mosqueira *et al*, 2001).

Os polímeros são macromoléculas formadas pela repetição de pequenas e simples unidades químicas (monômeros) ligadas umas às outras para formar estruturas lineares, ramificadas e/ou ligações cruzadas. No preparo das nanocápsulas são utilizados, geralmente, polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, os quais são degradados *in vivo* em metabólitos naturais do organismo ou em fragmentos menores facilmente excretados (Angelova *et al.*, 1999).

Diversos estudos foram realizados ao final da década de 60 para avaliar a utilização do polímero derivado do ácido lático (PLA). Os resultados demonstraram que esse polímero apresenta boa propriedade mecânica, baixa alergenicidade, excelente biocompatibilidade e uma cinética previsível de biodegradação, despertando assim a atenção de vários pesquisadores quanto a sua possível aplicação em tecnologia farmacêutica. A biodegradação desse polímero ocorre por erosão, através da clivagem de sua cadeia polimérica por hidrólise com consequente liberação do ácido lático. Por ser um metabólito natural do organismo, esse ácido é rapidamente eliminado pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água (Athanasiou *et al.*, 1996).

Após administração parenteral, as nanocápsulas de PLA são rapidamente removidas da circulação sanguínea pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) e por isso são classificadas de convencionais (Mosqueira *et al.*, 2000).

Sabe-se que as NC podem ser internalizadas pelas células por um processo denominado de endocitose, sendo este dividido em pinocitose e fagocitose. A via de internalização dessas nanocápsulas irá depender de suas características como tamanho, forma e carga superficial (Sahay *et al.*, 2010). No entanto, o mecanismo exato pelo qual essas características interferem na internalização das nanocápsulas ainda não é bem compreendido (Dobrovolskaia *et al.*, 2007).

A pinocitose é um processo pelo qual as células captam fluídos ou pequenas partículas através de minúsculos canais que se formam em sua membrana plasmática. A fagocitose é dependente da opsonização das nanocápsulas que ocorre através de adsorção de proteínas como imunoglobulinas, componentes do complemento e outras proteínas plasmáticas (Aderem *et al.*, 1999, Sahay, *et al.*, 2010). Este processo induz uma rápida eliminação das nanocápsulas da circulação sanguínea, uma vez que facilita o reconhecimento e a captação dessas nanocápsulas pelas células SFM, tais como as células de Küpffer do fígado e macrófagos do baço (Gref *et al.*, 1994). A remoção realizada por essas células é a maior limitação para a vetorização de fármacos a outros sítios no corpo humano, apesar deste fenômeno ter sido vantajosamente empregado no tratamento

de infecções intracelulares no fígado e baço tal como ocorre na leishmaniose (Mosqueira *et al*, 2001).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para modificar a superfície das nanocápsulas visando diminuir, retardar ou até mesmo eliminar a adsorção de proteínas plasmáticas e, consequentemente, prolongar o tempo de circulação das nanocápsulas no organismo (Soppimath *et al.*, 2001; Mosqueira *et al.*, 2001). Atualmente, não existem métodos capazes de bloquear completamente a opsonização das nanocápsulas, porém já foram desenvolvidos alguns métodos capazes de diminuir esse processo. Dentre os métodos utilizados para promover a "invisibilidade" das nanocápsulas diante do sistema imune, destacam-se o revestimento da superfície das nanocápsulas com polímeros hidrofílicos/surfactantes e desenvolvimento de copolímeros biodegradáveis com segmentos hidrofílicos para reduzir as interações eletrostáticas e hidrofóbicas, pelas quais as opsoninas se ligam à superfície das partículas. Dessa forma, para reduzir a opsonização e consequentemente aumentar a vida útil das nanocápsulas, é necessário que essas sejam preferencialmente recobertas com moléculas altamente hidrofílicas, de carga neutra ou próxima da neutralidade e pouco rígidas. Alguns dos materiais largamente utilizados no revestimento das superfícies são polietilenoglicol (PEG), poloxaminas, polissorbatos, lauriléters (Soppimath *et al.*, 2001).

Os copolímeros PEG são moléculas flexíveis, não iônicas, hidrofílicas e neutras, podendo ser adsorvidas fisicamente ou ligadas covalentemente na superfície das partículas, apresentando, portanto, excelente biocompatibilidade (Mosqueira *et al.*, 2001). O PEG é o polímero mais utilizado para modificar a superfície das nanocápsulas (Peracchia *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Mosqueira *et al.*, 2001).

Os polissacarídeos também são capazes de modificar a superfície dos sistemas micro e nanoparticulados modulando a ação do sistema complemento e mediando o reconhecimento por receptores específicos nas células. Um grande número de polissacarídeos vem sendo estudado com potencial aplicação em sistemas carreadores de fármacos, como a quitosana, pectina, ciclodextrina e dextranas (Ohya *et al.*, 2000)

A quitosana, α(1-4)-2-amino-2-deoxi β-D-glucana, é uma forma desacetilada da quitina, um polissacarídeo abundante presente nas conchas dos crustáceos, em insetos, moluscos e na parede celular de fungos. Quimicamente, a quitosana é um biopolímero de alto peso molecular, sendo uma

poliamina que apresenta propriedades que se relacionam com a presença de grupos amino livres em sua estrutura (Roberts, 1992; Goosen, 1996).

Em contraste com a maioria dos polímeros naturais, a quitosana apresenta carga positiva e propriedade mucoadesiva (Berscht *et al.,* 1994). Esse polissacarídeo também é bastante conhecido por apresentar várias atividades biológicas, incluindo atividade antitumoral, antifúngica e antimicrobiana (Qin *et al.,* 2002; Zheng *et al.,* 2003).

A quitosana tem ampla margem de segurança para administração oral e tópica, abrindo caminho às pesquisas para formulações de nanopartículas carregadas positivamente com boa estabilidade físico-química (Jumaa *et al.,* 1999). Explorando tais propriedades, sistemas carreadores de drogas, em que drogas hidrofóbicas são encapsuladas dentro de nanopartículas à base de quitosana têm sido amplamente estudados nos últimos anos, apresentando resultados promissores (Hamidi *et al.,* 2008). No entanto, existem poucos estudos a respeito da biodistribuição da quitosana através da sua administração intravenosa. Qi *et al.,* (2004) demonstraram que nanopartículas de quitosana, por apresentarem carga positiva, possuem grande afinidade pelas cargas negativas dos componentes da membrana celular e dessa forma podem promover toxicidade sobre as células.

Os revestimentos de polissacarídeos não apresentam a mesma eficiência de estabilização estérica fornecida pelo PEG, nem a mesma mobilidade das cadeias hidrofílicas. Além disso, os polissacarídeos podem desencadear reações imunológicas mais facilmente por se ligarem a receptores específicos em certas células ou tecidos (Lemarchand *et al.,* 2004). Prego *et al.,* (2010) demonstraram que nanopartículas de quitosana foram capazes de ativar uma resposta imune através do aumento da produção de anticorpos IgG.

A caracterização físico-química das nanocápsulas é de extrema importância uma vez que permite avaliar a estabilidade das preparações e determinar seu perfil de distribuição, bem como sua interação com células do SFM após administração intravenosa (Legrand *et al.,* 1999, Barratt 2000). Através da caracterização físico-química das nanocápsulas é possível determinar sua morfologia, distribuição de tamanho, potencial zeta (z), pH, concentração do fármaco associado às nanopartículas e cinética de liberação do fármaco a partir das nanopartículas (Legrand *et al.,* 1999, Schaffazick *et al,* 2003). O estudo da influência dessas características sobre a biocompatibilidade das nanocápsulas e sobre suas aplicações biológicas já é bem conhecido (McNeil 2005, Dobrovolskaia *et al.,* 2007). No entanto, o efeito dessas propriedades sobre o sistema imunológico ainda foi pouco explorado. Assim como muitos compostos, acredita-se que as nanocápsulas podem

ser reconhecidas como uma substância estranha pelas células do sistema imune e consequentemente podem ativar uma resposta imunológica (Hussain *et al.*, 2012, Dobrovolskaia & McNeil, 2007).

1.2. Inflamação e imunomodulação

Inflamação é um processo de múltiplos passos mediado por células imunes ativadas e pode se iniciar por diversos estímulos como lesão tecidual, infecção microbiana, irritação química ou por toxinas (Lin *et al.*, 2008).

Os macrófagos desempenham um papel central na iniciação e na propagação do processo inflamatório (Chen *et al.*, 2007). Amplamente distribuídos pelo corpo, os macrófagos são responsáveis por numerosos processos homeostáticos, imunológicos, inflamatórios e constituem uma defesa imediata contra elementos estranhos ao organismo. Algumas localizações particulares destas células incluem órgãos como baço, fígado (células de Kupffer), pulmões e órgãos linfoides (Adams, 1979; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Quando ativados, os macrófagos apresentam a capacidade de secretar moléculas sinalizadoras chamadas de citocinas, as quais dirigem a resposta imune. A capacidade dos macrófagos em produzir citocinas depende do grau de maturação, ativação e localização destas células (Cavaillon, 1994). As citocinas, proteínas de baixa massa molecular, são importantes porque permitem a comunicação entre células do sistema imune via receptores específicos presentes nas superfícies celulares (Chen *et al.*, 2007).

Os macrófagos respondem a uma variedade de estímulos endógenos e exógenos, sendo, em particular, o lipopolissacarídeo (LPS), um produto das bactérias gram-negativas, capaz de influenciar muitos aspectos da fisiologia destas células, aumentando o consumo de glicose e oxigênio, promovendo a morte de microrganismos e de células tumorais. Baixas concentrações de LPS são suficientes para sinalizar a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IFN-γ, IL-1, além de promover o aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), na secreção de NO e na produção do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Burk *et al.*, 2009).

O processo inflamatório é seguido por uma resposta anti-inflamatória que previne o dano excessivo ao hospedeiro. As citocinas TNF-α e interleucina-10 (IL-10) desempenham papel chave nesse processo, normalmente apresentando efeitos opostos. Além disso, a produção excessiva de

TNF-α induz a liberação de IL-10, que por sua vez regula a produção de TNF-α (Fiorentino *et al.*, 1991, Katsikis *et al.*, 1994).

A IL-10 representa uma das mais importantes citocinas imunorregulatórias (Mosmann & Coffman, 1989). Inicialmente, a IL-10 era denominada de fator de inibição da síntese de citocinas. (Howard *et al.*, 1992). Como outras citocinas, a IL-10 apresenta múltiplos efeitos biológicos sobre diferentes tipos de células. Seu efeito anti-inflamatório é devido, pelo menos em parte, a sua potente ação biológica sobre células como os macrófagos, células T, células B e uma variedade de outros tipos de células incluindo mastócitos, queratinócitos e algumas linhagens de células tumorais (Conti *et al.*, 2003). Uma de suas principais funções é suprimir a produção, por macrófagos, de citocinas e moléculas de superfície celular, através da inibição da atividade do fator transcripcional NF-κB (De Wall Malefyt *et al.*, 1991; McInnes *et al.*, 2001).

O fator de necrose tumoral (TNF) foi descoberto por Carswell *et al.*, (1975) no soro de camundongos infectados com o Bacillus Camette-Guerin (BCG). Estes autores identificaram o TNF como uma proteína do soro derivada de macrófagos estimulados por endotoxina, e capaz de causar lise de células tumorais *in vivo* (Souba, 1994).

O TNF é produzido primariamente por macrófagos (Mannel *et al.*, 1980), porém outros tipos celulares como linfócitos e células natural killer têm sido identificados como capazes de produzir esta citocina (Souba, 1994). Alguns vírus, tripanossomos, plasmódios e alguns organismos gram-positivos também podem estimular a produção de TNF, que também é detectada em outros estados fisiopatológicos, como lesões teciduais e processos malignos (Stovroff *et al.*, 1989; Souba, 1994). O TNF-α é considerado uma citocina pró-inflamatória que atua no recrutamento de leucócitos e na estimulação de fagócitos mononucleares para produção de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio (Wilhelm *et al.*, 2001).

O óxido nítrico, um gás radical livre, é produzido por diferentes tipos celulares, tais como células endoteliais vasculares, neurônios, células epiteliais do trato respiratório, fibroblastos, hepatócitos e macrófagos (Stuehr & Marleta, 1985; Billiar *et al.*, 1992; Song *et al.*, 2002). Como um radical livre, ele reage rapidamente com vários compostos, principalmente espécies contendo elétrons desemparelhados, como o oxigênio molecular e metais (Mayer & Hemmens, 1997). O óxido nítrico produzido por macrófagos tem um papel importante em processos patológicos, como a defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (Macmicking *et al.*, 1997).

O óxido nítrico é lábil e altamente reativo; difunde-se através da membrana, e apresenta um pequeno tempo de meia vida, somente alguns segundos (Van der Veen *et al.*, 2000). Por esta razão, este efetor atua somente nas células próximas do seu local de produção. Em soluções aquosas, o NO é rapidamente transformado em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Entre as ações do NO produzido pelo endotélio vascular estão o relaxamento da musculatura lisa vascular, redução da adesão e agregação plaquetária. O NO produzido por macrófagos está envolvido na ação citotóxica exercida por estas células contra certos microrganismos e células tumorais (Cotran *et al.*, 1994; Mayer & Hemmens, 1997). Porém, a produção descontrolada de NO pode levar a uma resposta maciça tóxica, implicada em uma série de doenças inflamatórias (Cotran et *al.*, 1994; Zhuang & Wogan, 1997).

A ativação de células imunes é desejada em várias condições, tais como em doenças infecciosas e em protocolos de vacinação. Por outro lado, uma resposta imune excessiva pode promover lesões teciduais severas e nesse caso a imunossupressão é desejada. Dessa forma, conhecendo o efeito das características das nanocápsulas sobre o sistema imune, será possível desenvolver partículas capazes de estimular ou suprimir células imunes. Esta característica imunomoduladora das nanocápsulas poderá ser utilizada para reforçar a atividade de determinadas drogas, aumentando assim a eficiência de tratamento para diversas doenças. Recentemente, Banerjee *et al.*, (2011) demonstraram que lipossomas com carga positiva, por si só, foram capazes de estimular o sistema imune induzindo o aumento da produção de NO. Além disso, foi demonstrado que esses lipossomas apresentaram a capacidade de potencializar o efeito da paromomicina, promovendo assim, a cura da leishmaniose visceral em camundongos BALB/c.

1.3. Leishmaniose Visceral

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por várias espécies de protozoários unicelulares digenéticos pertencentes à ordem *Kinetoplastidae*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (Ross 1903; Lainson *et al.*, 1979). O parasito é transmitido por hospedeiros invertebrados capazes de infectar desde o homem até animais silvestres e domésticos. Os hospedeiros invertebrados se limitam às espécies de flebotomíneos hematófagos que pertencem ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e ao *Lutzomyia* no Novo Mundo (Desjeux *et al.*, 2004).

Todas as espécies de *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios no hospedeiro vertebrado (Lainson *et al.*, 1992). O parasito pode ser encontrado em mamíferos como raposas,

cães, roedores e humanos. A raposa e os roedores estão envolvidos no ciclo silvestre e rural, enquanto o cão se correlaciona, principalmente, com o ciclo urbano do parasito (Ashford, 1996).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), as leishmanioses podem ser classificadas em quatro formas clínicas: leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral. Os mecanismos pelos quais o parasita induz diferentes formas clínicas da doença incluem fatores como a virulência do parasita, características genéticas do hospedeiro e o tipo de resposta do hospedeiro dependente da resistência inata e da imunidade adquirida (Herwaldt, 1999; Silveira *et al.,* 2005; Pinheiro *et al.,* 2006).

A leishmaniose visceral é causada principalmente pelas espécies *L. donovani*, *L. infantum e L. chagasi* (Barral *et al.,* 1991). Apesar das diferenças no nome e na origem geográfica, os achados moleculares sugerem que *L. infantum e L. chagasi* sejam a mesma espécie. O parasita é inoculado na pele e migra, via circulação linfática e sanguínea, infectando células do sistema fagocítico mononuclear de diferentes órgãos como baço, linfonodos, fígado e medula óssea (Mauricio *et al.,* 2000; Lukes *et al.,* 2007).

A leishmaniose visceral, também conhecida como "Kala-azar" é a forma mais grave da doença e caracteriza-se por febre alta, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e anemia. Essa forma clínica possui grande importância epidemiológica devido à sua elevada taxa de mortalidade que ocorre principalmente em pacientes não tratados (Desjeux *et al.,* 2004, Murray *et al.,* 2005).

Estima-se que 350 milhões de pessoas, em 88 países no mundo, estejam em risco de contrair leishmaniose. Atualmente, são relatados cerca de 2 milhões de novos casos por ano sendo meio milhão da forma visceral (WHO 2010). Aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão, Etiópia e Nepal (Chappuis *et al.,* 2007).

Na década de 90, a maioria dos casos notificados de leishmaniose visceral no Brasil ocorreu na Região Nordeste. No entanto, essa situação vem se modificando à medida que a doença se expande para as outras regiões, atingindo áreas urbanas e periurbanas. Atualmente, a leishmaniose visceral possui aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, apresentando ampla distribuição nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Marzochi *et al.,* 2009).

De acordo com o Ministério da Saúde, 26.528 novos casos de leishmaniose visceral são registrados por ano (Ministério da Saúde 2006). A letalidade da doença subiu de 3,2% para 5,6%

entre 2000 e 2008 e a maior morbidade ficou na faixa etária a partir dos 50 anos, embora a doença seja mais comum entre crianças de até 10 anos (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008).

As opções de tratamento para a leishmaniose visceral consistem essencialmente de medicamentos cuja administração é por via parenteral, necessitando muitas vezes de hospitalização. Além disso, são inúmeros os relatos de efeitos colaterais, toxicidade e resistência relacionados a esses medicamentos (WHO, 2010). Na perspectiva de contornar essas limitações, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para a utilização de nanopartículas para a vetorização desses medicamentos. (Durand *et al.*, 1997, Heurtault *et al.*, 2001, Manandhar *et al.*, 2008).

Embora ainda não tenham revolucionado inteiramente o nosso quotidiano, as nanopartículas são os componentes chave no mercado futuro da alta tecnologia. O desenvolvimento de nanopartículas a serem empregadas como alternativas na terapia da leishmaniose tem sido alvo de muitos estudos (Dey *et al.*,2000, Banerjee *et al.*, 2008a,b). Além disso, o entendimento mais aprofundado do efeito dessas nanopartículas sobre a resposta imune poderá ampliar e melhorar muito suas áreas de aplicação.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de nanocápsulas com diferentes características superficiais (nanocápsulas polimérica derivada do ácido lático - PLA, nanocápsulas de PLA revestida com polietilenoglicol - PLA-PEG e nanocápsulas de PLA revestida com quitosana - PLA-QUI) sobre a resposta imune de células J774.A1 e sobre a infecção causada por *L. infantum*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito das nanocápsulas, na presença ou ausência de soro fresco de camundongos BALB/c, sobre a viabilidade de células J774.A1 através do ensaio de MTT;
- Avaliar o efeito das nanocápsulas, na presença ou não de soro fresco de camundongos BALB/c, sobre a produção de NO e citocinas (TNF-α, IL-10) por células J774.A1 estimuladas ou não com LPS e IFN-γ.
- Analisar por microscopia confocal a internalização das nanocápsulas marcadas com ftalocianina de cloro e alumínio, na presença ou não de soro fresco de camundongos BALB/c, pelas células J774.A1 estimuladas com LPS e IFN-γ.
- Quantificar a interação das nanocápsulas marcadas com ftalocianina de cloro e alumínio, na presença ou não de soro fresco de camundongos BALB/c, com células J774.A1 estimuladas com LPS e IFN-γ.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com as nanocápsulas, na presença ou não de soro fresco de camundongos BALB/c, sobre a produção de NO e citocinas (TNF-α, IL-10) por células J774.A1 estimuladas ou não com LPS e IFN-γ.
- Avaliar o efeito das nanocápsulas, na presença ou não de soro fresco de camundongos BALB/c, sobre a carga parasitária de células J774.A1 infectadas com *L. infantum* e estimuladas ou não com LPS e IFN-γ.
- Avaliar o efeito das nanocápsulas, na presença ou não de soro fresco de camundongos BALB/c, sobre a produção de NO e de citocinas (TNF-α, IL- 10) por células J774.A1 infectadas com *L. infantum* e estimuladas ou não com LPS e IFN-γ.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

Macrófagos murinos J774-A1 (catalog n^{o}. TIB-67) foram mantidos em frascos plásticos de cultura (TPP, Suíça) em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Brasil) suplementado com 100 U/mL de penicilina G (Sigma-Aldrich, Brasil), 100 µg/mL sulfato de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina (GIBCO BRL), 1mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, Brasil), 1% aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich, Brasil) e 10% de soro fetal bovino inativado (SFB; LGC Biotecnologia, Brasil) - (RPMI 10% de SFB). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2. Para os experimentos, as células foram retiradas dos frascos utilizando *cell scraper* e a sua contagem foi realizada em câmara de Neubauer após diluição em azul de tripan.

3.2. Animais

Neste trabalho, foram utilizados 40 camundongos (machos e fêmeas) da linhagem BALB/c para obtenção do soro fresco. Os animais foram obtidos do Centro de Ciência Animal da UFOP onde receberam ração e água *ad libidum*.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (protocolo número 2011/80) da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.3. Preparo das Nanocápsulas

As nanocápsulas foram preparadas através do processo de deposição interfacial de um polímero pré-formado, descrito por Fessi *et al.*, (1989). Essa técnica consiste na mistura de uma fase orgânica (contendo um solvente orgânico, óleo, surfactante lipofílico e polímeros insolúveis) miscível em uma fase aquosa contendo surfactante hidrofílico (Figura 2).

Na fase orgânica, 12 mg do polímero PLA - poli-(D,L-ácido láctico 42000 *Da)*- foram adicionados em uma solução contendo 15 mg de lecitina (Epikuron 170®, Lucas Meyer, França), 50 µL de óleo triglicerídeo cáprico/caprílico (Velsan), 4 mL de acetona e 4 mL de etanol. Na fase aquosa, 15 mg de poloxamer 188 (Synperonic) foram adicionados em 16 mL de água Milli-Q. Essas soluções foram mantidas sob agitação magnética até completa dissolução dos componentes. Em seguida, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa e a mistura resultante foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos para permitir a formação das nanocápsulas. Durante esse tempo, o

polímero sofre precipitação na interface pela redução da sua solubilidade na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos solventes fornece uma energia favorável para a formação de gotículas de óleo que servem como núcleo para a precipitação do polímero. É possível observar o surgimento de uma suspensão leitosa, opalescente devido à formação das nanocápsulas. Em seguida, o excesso de solvente foi removido sob pressão reduzida em rotavapor (Heidolph Instruments, Alemanha) à temperatura de 40°C até o volume final de 2 mL.

As nanocápsulas de PLA-PEG foram preparadas pelo método descrito por Mosqueira *et al.*, (2001), o qual é semelhante ao método descrito anteriormente, entretanto, utiliza-se 15 mg do copolímero PLA-PEG (66.000 KDa copolimerizado com PEG 5 KDa, Alkermes EUA) na fase orgânica.

No preparo das nanocápsulas de quitosana (PLA-QUI), primeiramente preparou-se uma solução de quitosana (baixo peso molecular) 1 mg/mL de ácido acético 0,05 molar. Para o preparo da fase orgânica, adicionou-se 5 mg de PLA em uma solução contendo 50 µL de óleo (Velsan, triglicerídeo cáprico/caprílico) e 7 mL de acetona. Em seguida, essa solução foi vertida em uma solução aquosa contendo 5 mL da solução de quitosana em ácido acético, 15 mg de poloxamer 188 (Synperonic) e 11 mL de água Milli-Q. A mistura resultante foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos e o excesso de solvente foi removido sob pressão reduzida em rotavapor até o volume final de 1 mL. Após evaporação do solvente, foi realizada a diálise da suspensão para remoção do ácido acético.

O desenvolvimento e os ensaios de caracterização físico-química das nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) utilizadas neste projeto foram realizados previamente por Oliveira *et al.*, 2011.

Para confirmar a eficiência no preparo das nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI descrito por Oliveira *et al.*, 2011, determinou-se o tamanho médio das nanocápsulas e o índice de polidispersão das suspensões de nanocápsulas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS). O equipamento utilizado foi o Nanosizer N5 PLUS Beckmann Coulter (Fullerton, EUA) do Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanobiotecnologia – CIPHARMA. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão. O índice de polidispersão reflete a homogeneidade no tamanho das partículas. Segundo instruções do equipamento, amostras com índice de polidispersão inferior a 0,3 podem ser consideradas

monodispersas (Beckmann Coulter). Além disso, todas as suspensões de nanocápsulas foram filtradas para realização dos ensaios utilizando unidade filtrante estéril de 0,8 μm (Millex).

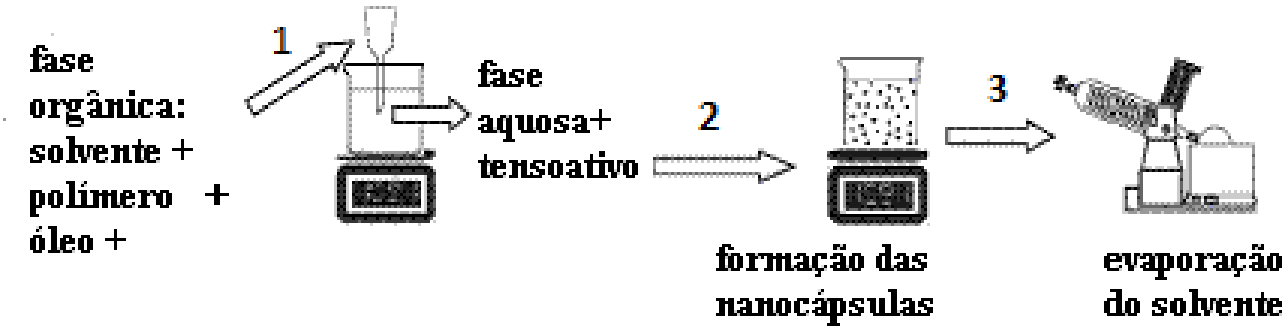

Figura 2. Etapas de preparação de nanocápsulas. 1) A solução orgânica é vertida na solução aquosa; 2) A suspensão obtida é mantida em agitação magnética por 10 minutos; 3) O excesso de solvente é evaporado.

3.4. Determinação da viabilidade celular

Para avaliar o efeito das nanocápsulas de PLA, PLA-PEG, PLA-QUI sobre a viabilidade de células J774-A1, utilizou-se a técnica de MTT (Mosmann *et al.*, 1983, Sieuwerts *et al*. 1995). O ensaio baseia-se na capacidade que as células viáveis têm de clivar o anel tetrazólio presente no sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), de coloração amarela, pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria, formando cristais de formazan, insolúveis de coloração azul.

A suspensão celular na concentração de 1 x 10^6 células/mL foi adicionada em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça). As placas foram então mantidas por 2 horas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO_2 para adesão das células ao poço. Após este período todos os poços foram lavados com 200 μL de PBS estéril para retirar as células que não aderiram e em seguida foram adicionados 50 μL de meio RPMI 10% de SFB em todos os poços. A seguir, foram adicionados aos poços 50 μL de meio RPMI 10% SFB contendo concentrações crescentes das nanocápsulas (PLA, PLA-PEG, PLA-QUI), na presença ou na ausência de soro fresco de camundongos BALB/c (fonte de complemento e anticorpo). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Como controle, as células foram incubadas na presença de meio de cultura, correspondendo a 100% de viabilidade.

Para eliminar a interferência ocasionada pela presença das nanocápsulas na determinação da viabilidade por MTT, após 24 h de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com auxílio de pipeta automática. Todos os poços foram então lavados duas vezes com 200 µL de PBS estéril para remoção das nanocápsulas do meio. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 µL de meio de cultura e 20 µL da solução de MTT (SIGMA) a 2,5 mg/mL em PBS. A placa foi incubada por mais 4 h em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Os cristais azuis de formazan, resultado da redução do MTT pelas células viáveis, foram dissolvidos pela adição de 100 µL de SDS a 10% em HCl 10 mM, seguido por um período de incubação de 16 h, nas mesmas condições anteriores, permitindo assim a completa solubilização dos cristais. A leitura da absorbância foi feita em leitor de microplaca (Molecular Devices) utilizando comprimento de onda 570 nm.

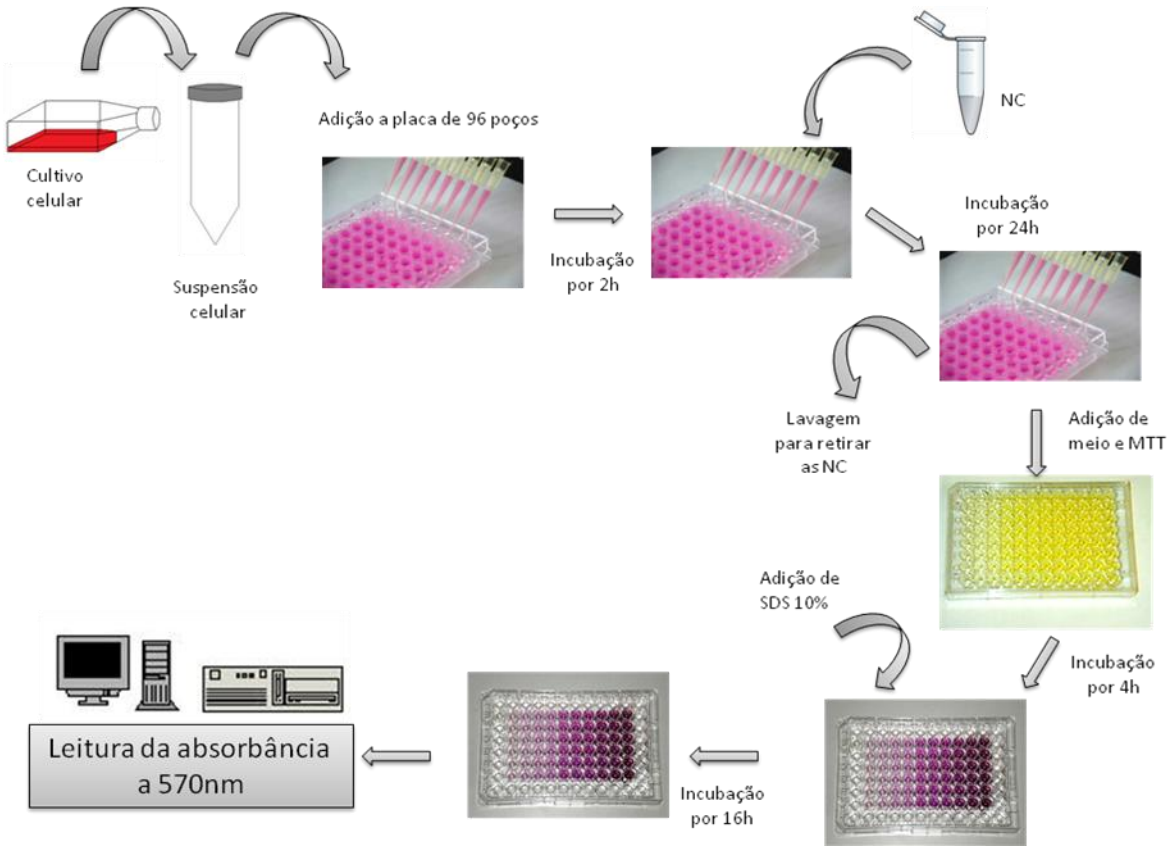

Figura 3. Esquema resumido do ensaio de viabilidade celular

3.5. Efeito das nanocápsulas sobre a produção de óxido nítrico

A produção de NO pelas células J774.A1 foi determinada pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante celular utilizando o método de *Griess* (Green *et al.*, 1982), descrito a seguir.

A suspensão celular na concentração de 1 x 10^6 células/mL foi adicionada em microplacas de 48 poços (TPP, Suíça). As placas foram então mantidas por 2 horas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO_2 para adesão das células ao poço. Após este período todos os poços foram lavados com 200 μL de PBS estéril para retirar as células que não aderiram e em seguida foram adicionados 200 μL de meio RPMI 10% de SFB em todos os poços. A seguir, adicionou-se aos poços 200 μL de RPMI 10% de SFB contendo concentrações crescentes das nanocápsulas (PLA, PLA-PEG, PLA-QUI), na presença ou na ausência de soro fresco de camundongos BALB/c e de estímulo (25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2.

Para eliminar a interferência ocasionada pela presença das nanocápsulas na dosagem de NO, após 24 h de incubação o sobrenadante celular foi adicionado a um eppendorf contendo filtro de 100 nm e em seguida foi centrifugado a 620 *x* g por 15 minutos. Após centrifugação, 50 μL do filtrado foi coletado e misturado a 100 μL de reagente de *Griess* (mistura 1:1 de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 2,5% e di-idrocloreto de N-[1-naftil]-etilenodiamino 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%). A placa foi incubada ao abrigo da luz por 10 minutos à temperatura ambiente.

A leitura da absorbância foi feita em leitor de microplaca (Molecular Devices) utilizando comprimento de onda 570 nm. A concentração de nitrito foi calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão obtida a partir de uma solução de nitrito de sódio 1mM em RPMI 10% de SFB. Na obtenção da curva padrão, r^2 foi superior a 0,98.

O restante do sobrenadante filtrado foi armazenado a -20ºC para posterior quantificação das citocinas TNF-α e IL-10.

3.6. Determinação da produção de TNF-α e IL-10

As citocinas TNF-α e IL-10 foram quantificadas no sobrenadante celular previamente congelado (item 3.7) através do teste imunoenzimático de ELISA de captura (PeproTech), de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir.

Em uma microplaca de 96 poços de poliestireno (TPP, Suíça), adicionou-se a cada poço 100 μL de anticorpos de captura monoclonal anti TNF-α ou anti IL-10 em tampão fosfato-salino (PBS). As placas foram então incubadas por 16 horas à temperatura ambiente para adequada adsorção dos anticorpos. Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (solução de lavagem). Em seguida, adicionou-se em cada poço 200 μL da

solução de bloqueio (PBS contendo 1% de soro fetal bovino) e a placa foi incubada à temperatura ambiente, por 1 h. Após esse período, as placas foram lavadas 4 vezes com a solução de lavagem. Adicionou-se a cada poço 100 μL do sobrenadante da cultura celular de macrófagos anteriormente coletado (item 3.5). Aos poços padrão adicionou-se 100 μL do padrão de citocinas (TNF-α ou IL-10) em diferentes concentrações. As placas foram então incubadas por 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes com a solução de lavagem e em seguida foram adicionados 100 μL/poço do anticorpo de detecção - anticorpo anticitocina (TNF-α ou IL-10) de camundongo marcado com biotina - em PBS contendo 0,05% de Tween-20 e 0,1% de soro fetal bovino (solução diluente). As placas foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente e lavadas 4 vezes com a solução de lavagem. Adicionou-se 100 μL/poço do conjugado avidina-peroxidase em PBS contendo 0,05% de Tween-20 e 0,1% de solução diluente e as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas 8 vezes com solução de lavagem, adicionando-se em seguida 100 μL/poço do substrato (10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina e 1,2 mM de H_2O_2). A reação foi interrompida com a adição de 50 μL de solução de SDS 1% a cada poço.

A absorbância foi lida a 405 nm em leitor de microplaca e a concentração das citocinas foi calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão estabelecida com concentrações conhecidas de cada padrão (TNF-α e IL-10). Na obtenção da curva padrão, o r^2 foi superior a 0,98.

3.7. Avaliação da internalização das nanocápsulas pelas células J774.A1

3.7.1. Análise por microscopia confocal

A suspensão celular na concentração de 1 x 10^6 células/mL foi adicionada aos poços de microplacas de 24 poços (TPP, Suíça) contendo em cada poço 1 lamínula de vidro de 13 mm. As placas foram mantidas por 2 horas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO_2 para adesão das células às lamínulas. Após este período todos os poços foram lavados com 500 μL de PBS estéril para retirar as células que não aderiram e em seguida foram adicionados 500 μL de meio RPMI 10% de SFB em todos os poços. As células foram estimuladas (25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ) e tratadas, na presença ou na ausência de soro fresco de camundongos BALB/c, com as diferentes nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) contendo ftalocianina de cloro e alumínio (AlClPC) encapsulada. As placas foram então incubadas por 24 horas em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com 500 μL de PBS para remover as

nanocápsulas que não foram internalizadas. Em seguida as células foram fixadas em solução de formalina 3,7% por 25 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, os poços foram lavados com PBS. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 por 15 minutos à temperatura ambiente. Para marcação do núcleo celular, adicionou-se diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI – Sigma, EUA) por 20 minutos. A lamínulas foram montadas utilizando-se uma solução de glicerol e Tris-base, na proporção de 90:10 (v/v) e pH 9,0. As células foram analisadas no microscópio confocal Zeiss 510.

3.7.2. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação da internalização celular das nanocápsulas poliméricas contendo o marcador fluorescente AlClPC foi realizada por CLAE utilizando o cromatógrafo Waters Aliance 2695 acoplado ao detector de fluorescência Waters 2475 nas condições cromatográficas descritas e validadas por nosso grupo de pesquisa (Oliveira *et. al.* 2011). Empregou-se para separação uma coluna de marca Phenomenex®, modelo Gemini-NX 5µ C18, de 150 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 µm e pré-coluna de marca Phenomenex®, modelo AJ0-4287 C18, de 0,5 cm de comprimento 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 µm.. A fase móvel foi constituída por mistura de metanol, dimetilformamida (DMF) e acetona, na proporção de 80:5:15 (v/v/v). Filtrou-se a solução em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. Para degaseificar, levou-se a solução ao banho ultrassônico por trinta minutos. O fluxo e temperatura utilizados foram de 1,0 mL/min e 30°C, respectivamente. Para análise foram injetados 10 µL de cada amostra, e o comprimento de onda empregado no detector de fluorescência foi de 610 nm para excitação e 675 nm para emissão. O tempo de corrida de cada amostra foi de 5 minutos

A suspensão celular na concentração de 1 x 10^6 células/mL foi adicionada em microplacas de 24 poços (TPP, Suíça). As placas foram então mantidas por 2 horas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO_2 para adesão das células ao poço. Após este período todos os poços foram lavados com 500 µL de PBS estéril para retirar as células que não aderiram e em seguida foram adicionados 200 µL de meio RPMI 10% de SFB em todos os poços. As células foram estimuladas (25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ) e tratadas, na presença ou na ausência de soro fresco de camundongos BALB/c, com as diferentes nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) contendo a mesma concentração de AlClPC encapsulada. As placas foram incubadas por 24 e 4 horas em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com 500 µL de PBS para

remover as nanocápsulas que não foram internalizadas. Em seguida, adicionou-se aos poços 300 µL de Triton X-100 0,1% por 30 minutos para lisar as células. Após esse período, foi realizado o procedimento de extração do marcador fluorescente das amostras adicionando-se 0,5 mL de acetato de etila e homogeneizando em agitador vórtex por 10 minutos. Após centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, a solução resultante foi filtrada em unidade filtrante Millex com membrana Durapore® (13 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm) e analisada por CLAE. A concentração de AlClPC foi calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão obtida a partir de uma solução de AlClPC 100 µg/mL em solução etanólica. Na obtenção da curva padrão, r^2 foi superior a 0,98.

Um experimento adicional foi realizado para avaliar se a AlClPC se mantém encapsulada nas nanocápsulas sem ser liberada durante o processo de incubação. Foi inserido um insert (COSTAR) com membrana de 0,1 µm sobre cada poço para separar as nanocápsulas contendo a AlClPC das células aderidas. Como resultado, foi observado que a AlClPC (fluorescência) não foi detectada livre no meio de cultura e nem associado às células aderidas. Este controle foi realizado também com as células utilizadas para a análise confocal descrito acima.

3.8. Efeito das nanocápsulas sobre células J774.A1 infectadas com *Leishmania infantum*

3.8.1. Cultura de *Leishmania*

Foram utilizadas para a infecção experimental formas promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa selvagem C43 isolada de cão sintomático e tipada por *Restriction Fragment Length Polymorphism*- RFLP). Essa cepa foi gentilmente cedida pelo Dr. Alexandre Barbosa Reis do DEACl, Escola de Farmácia - UFOP. Os parasitos foram cultivados em estufa BOD a 25°C em *Grace´s Insect Medium* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (previamente inativado a 56°C/30 min), 2 mM L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina G potássica, pH = 6,5.

3.8.2. Infecção Experimental

Para a infecção das células J774.A1, a cultura de *Leishmania* foi iniciada com $1x10^5$ formas promastigotas/mL. No quinto dia de cultura (início da fase estacionária), as células foram diluídas em formalina 4% e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1540 *x* g, a 4°C por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em meio RPMI 10% de SFB pH 7,2.

A suspensão de macrófagos J774.A1 na concentração de 1 x 10^6 células/mL (100 μL) foi adicionada em microplacas de 24 poços (TPP, Suíça) contendo 1 lamínula de vidro de 13mm por poço. As placas foram então mantidas por 2 horas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO_2 para adesão das células às lamínulas. Após este período todos os poços foram lavados com PBS estéril para retirar as células que não aderiram e em seguida foram adicionados 200 μL de meio RPMI 10% de SFB em todos os poços. Adicionou-se aos poços 200 μL de suspensão de parasitos, numa taxa de 10 parasitos por macrófago. As placas foram então incubadas por 3 horas em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. Após esse período de incubação, as culturas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos não internalizados. Em seguida, adicionou-se aos poços 200 μL de RPMI 10% de SFB contendo concentrações crescentes das nanocápsulas (PLA, PLA-PEG, PLA-QUI), na presença ou na ausência de soro fresco de camundongos BALB/c e estímulo (25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. Após esse período, o sobrenadante foi coletado para dosagem de NO e citocinas (TNF-α e IL-10).

As lamínulas foram fixadas com metanol (Vetec Fine Chemistry) por 10 minutos e, então, coradas com o kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), conforme instruções do fabricante. A análise foi realizada pela contagem de células contendo parasitos internalizados utilizando microscópio óptico Olympus BX50 (Olympus, Center Valley, PA, USA). Foram avaliados a porcentagem de macrófagos infectados e o número de parasitos por macrófago. Foram avaliadas pelo menos 200 células.

3.9. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± d.p. (desvio padrão), obtidos a partir de três experimentos independentes em duplicata. A análise de variância (One-way ANOVA) seguida pelo teste *Bonferroni* para comparações múltiplas foram utilizados para comparar as médias entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0,05$ usando o programa *Graph Pad Prism* (versão 5.01).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Preparo das nanocápsulas

As nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI (Figura 4) foram obtidas pelo método de nanoprecipitação que se baseia na difusão do solvente orgânico em meio aquoso, promovendo assim a deposição interfacial do polímero. A Tabela 1 mostra os dados de caracterização das nanocápsulas. É possível observar que os índices de polidispersão estão abaixo de 0,3 e dessa forma, as amostras podem ser consideradas como sendo monodispersas. Além disso, o tamanho das nanocápsulas foi muito semelhante, o que é adequado para estudar as diferentes características superfíciais, uma vez que o tamanho também pode interferir no efeito das nanocápsulas sobre as células. O tamanho obtido para cada tipo de nanocápsula se assemelha aos de Oliveira *et al.*, (2011), demonstrando assim que a técnica foi executada com eficiência.

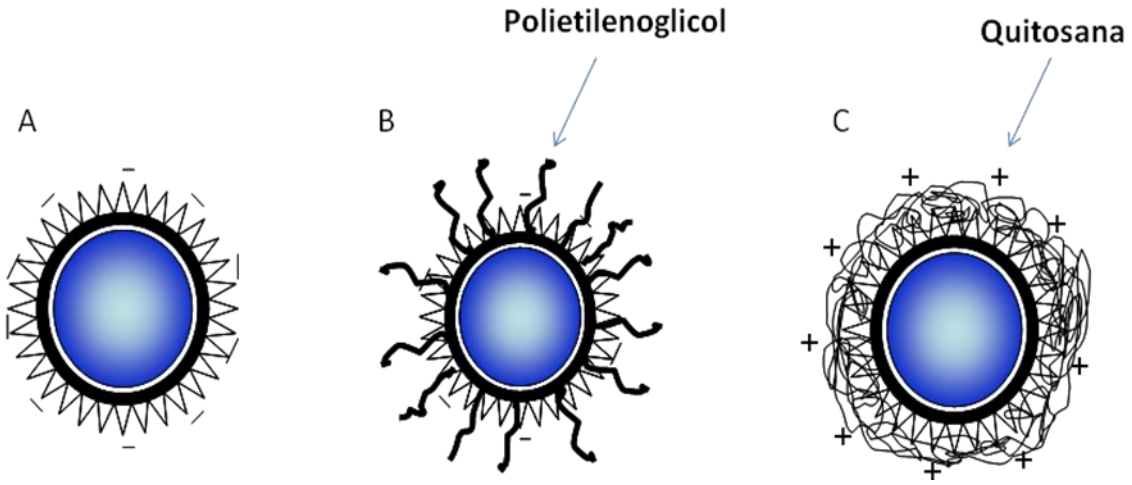

Figura 4. Representação esquemática da nanoestrutura das diferentes nanocápsulas. (A) nanocápsula polimérica derivada do ácido lático (PLA), (B) nanocápsula revestida com polietilenoglicol (PLA-PEG) e (C) nanocápsula revestida com quitosana (PLA-QUI).

Tabela 1. Caracterização das nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI

Nanocápsulas	Tamanho (nm) (Média ± desvio padrão)	Índice de Polidispersão (Média ± desvio padrão)	Potencial Zeta (mV) (Média ± desvio padrão)
PLA	199,2 ± 2,00	0,163 ± 0,040	- 46,4 ± 0,80
PLA-PEG	152,4 ± 2,66	0,230 ± 0,090	-40,9 ± 0,04
PLA-QUI	240,0 ± 1,89	0,086 ± 0,014	+6,9 ± 0,10

4.2. Determinação da viabilidade celular

Visando avaliar se as nanocápsulas com diferentes características superficiais apresentam efeito sobre a viabilidade de células J774.A1, foi realizado um ensaio de redução do MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este ensaio mede a atividade mitocondrial de células viáveis, sendo sensível para avaliar a viabilidade e atividade celular (Mosmann *et al.*, 1983).

O teste de viabilidade foi realizado 24 h após a incubação das células J774-A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA, PLA-PEG, PLA-QUI na presença ou ausência de soro fresco de camundongos BALB/c.

Observou-se que quando as células foram incubadas com as nanocápsulas de PLA não houve citotoxicidade, situando-se os valores de viabilidade próximos a 100% (Figura 5-A). Na presença de soro fresco de camundongos BALB/c, houve uma acentuada redução da viabilidade das células incubadas com nanocápsulas de PLA nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL (Figura 5-B).

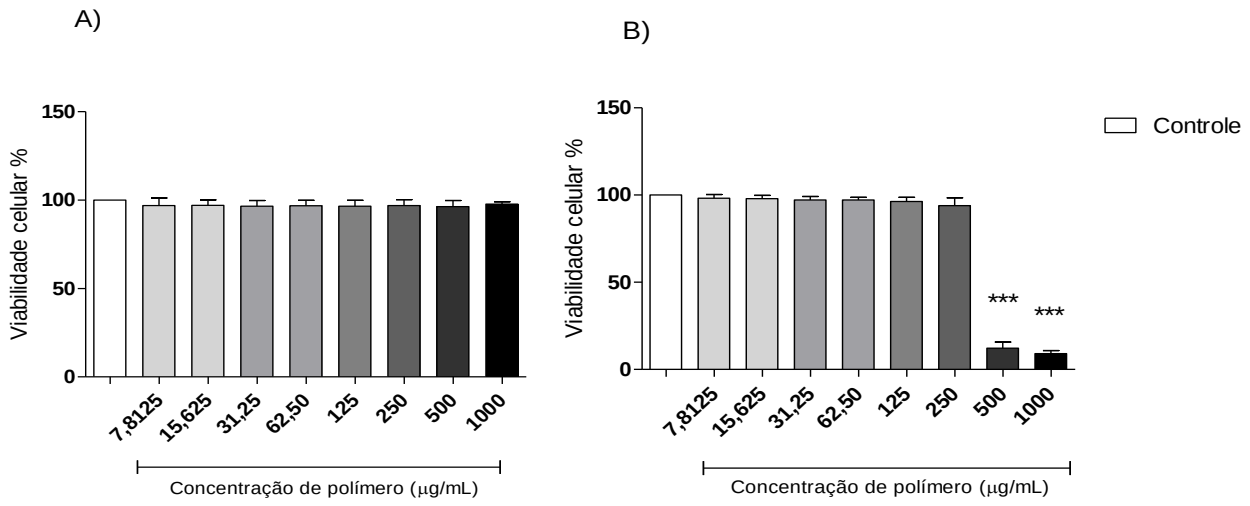

Figura 5. A) Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a viabilidade de células J774.A1 em relação às células não tratadas, consideradas 100% de viabilidade. B) Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA na presença de soro fresco de camundongos BALB/c sobre a viabilidade de células J774.A1 em relação às células não tratadas. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). ***P < 0,001

As nanocápsulas de PLA-PEG, na ausência de soro, não tiveram efeito tóxico sobre as células J774.A1 (Figura 6-A), visto que a viabilidade celular se manteve sempre próxima a 100%, independente da concentração utilizada de nanocápsulas. Assim como foi observado para as nanocápsulas de PLA, na presença do soro fresco de camundongos BALB/c, as nanocápsulas de PLA-PEG nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL induziram uma redução significativa da viabilidade celular (Figura 6-B).

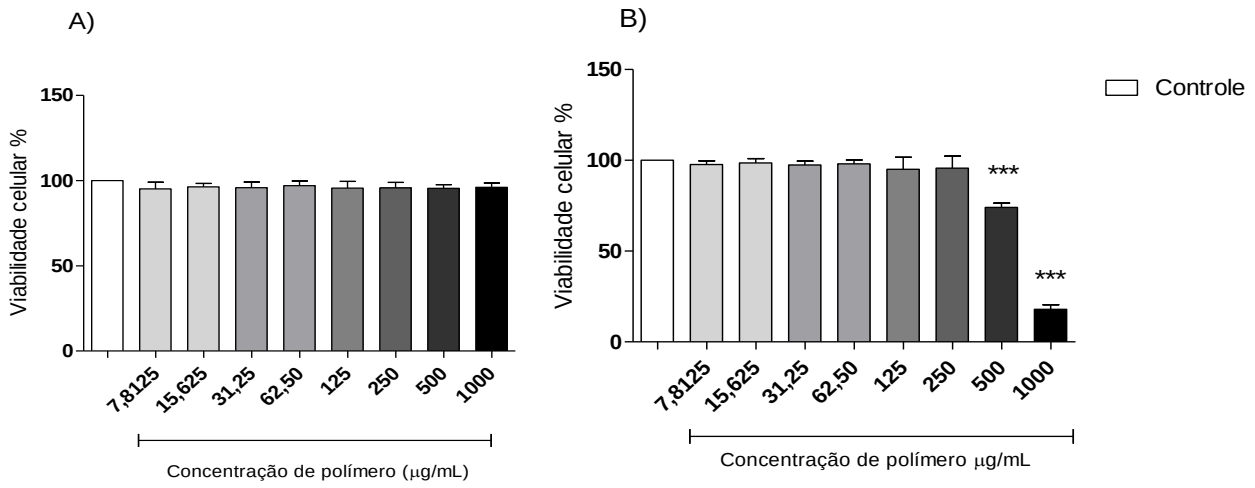

Figura 6. A) Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a viabilidade de células J774.A1 em relação às células não tratadas, consideradas 100% de viabilidade. B) Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG na presença de soro fresco de camundongos BALB/c sobre a viabilidade de células J774.A1 em relação às células não tratadas. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). ***P < 0,001.

A Figura 7-A mostra que a viabilidade celular sofreu uma redução significativa nas células incubadas com as nanocápsulas de PLA-QUI nas concentrações de 1000 µg/mL a 31,25 µg/mL. Na presença do soro fresco, a redução da viabilidade pôde ser observada em todas as concentrações testadas (Figura 7-B).

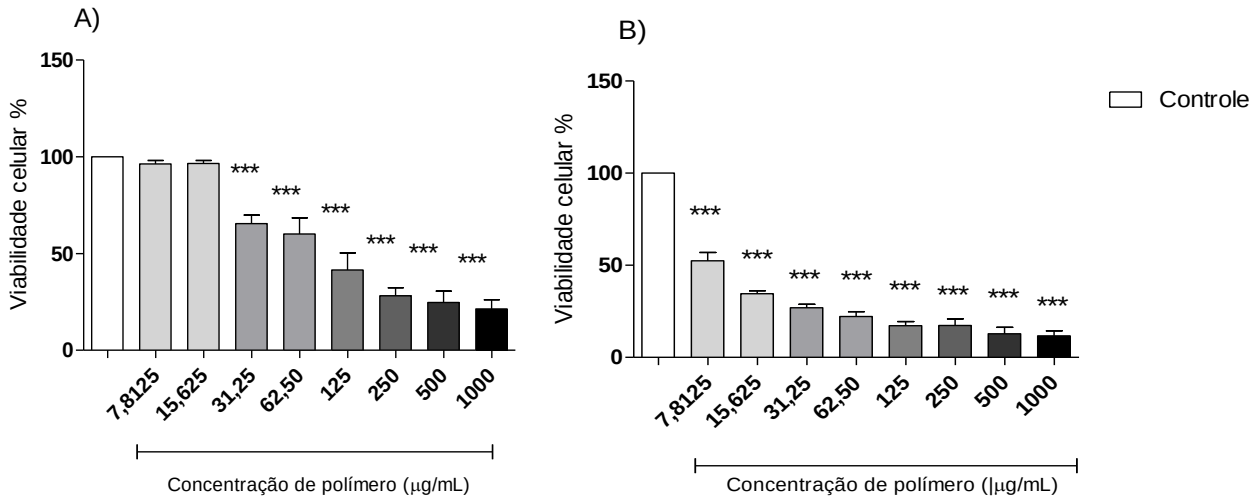

Figura 7. A) Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a viabilidade de células J774.A1 em relação às células não tratadas, consideradas 100% de viabilidade. B) Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI na presença de soro fresco de camundongos BALB/c sobre a viabilidade de células J774.A1 em relação às células não tratadas. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). ***P < 0,001.

Com o objetivo de avaliar se o efeito tóxico das nanocápsulas de PLA-QUI foi decorrente da presença de quitosana, foi realizado um teste de MTT incubando as células J774.A1 na presença da quitosana pura utilizada no preparo dessas nanocápsulas. Os resultados demonstram que a quitosana pura induziu uma citotoxicidade significativa sobre as células J774.A1 (Figura 8).

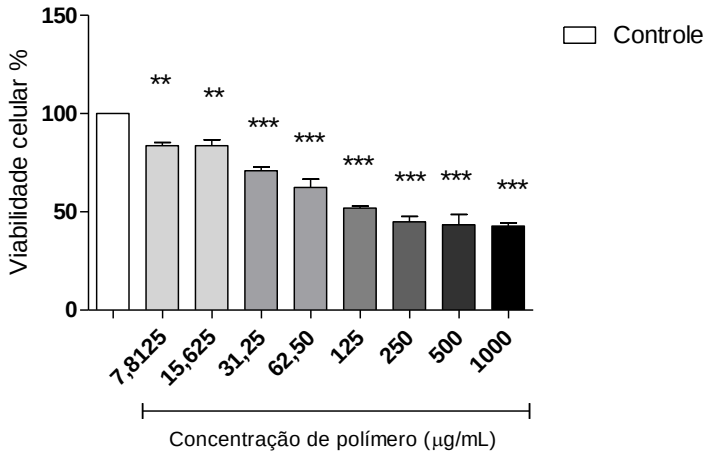

Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de quitosana pura sobre a viabilidade de células J774.A1 em relação às células não tratadas, consideradas 100% de viabilidade. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média± d.p (desvio padrão), **P < 0,01 e ***P < 0,001.

Como as concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI testadas foram muito tóxicas para as células, foi realizado um novo teste de viabilidade celular utilizando concentrações menores dessas nanocápsulas na presença e na ausência de soro de BALB/c. De acordo com a Figura 9-A, pode-se observar que as concentrações menores de nanocápsulas de quitosana (PLA-QUI) não tiveram efeito tóxico sobre as células. Porém, na presença do soro de camundongos BALB/c, essas nanocápsulas nas concentrações de 10 e 5 µg/mL promoveram uma diminuição significativa da viabilidade das células J774.A1 (Figura 9-B).

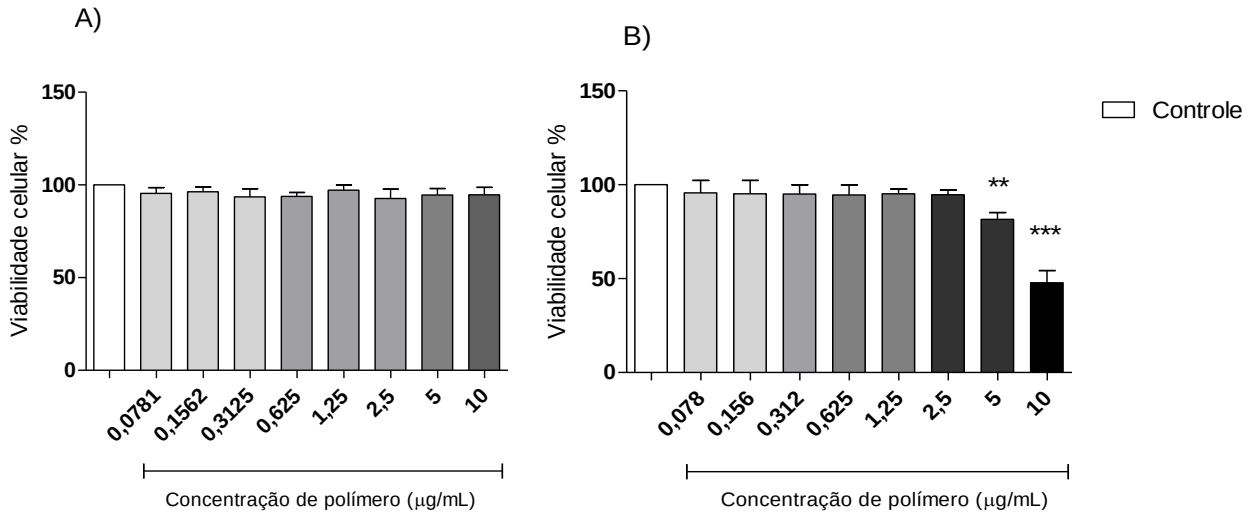

Figura 9. A) Viabilidade de células J774.A1 na presença de concentrações menores de nanocápsulas de PLA-QUI em relação às células J774.A1 não tratadas, consideradas 100% de viabilidade. B) Viabilidade de células J774.A1 na presença de concentrações menores de nanocápsulas de PLA-QUI e soro fresco de camundongos BALB/c em relação às células J774.A1 não tratadas. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média± d.p. (desvio padrão). **P < 0,01 e ***P < 0,001.

Para a realização dos próximos experimentos, foram escolhidas as concentrações de nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) mais altas e não citotóxicas para as células J774.A1.

4.3. Efeito das nanocápsulas sobre a produção de óxido nítrico

O IFN-γ, citocina pró-inflamatória, e o lipopolissacarídeo (LPS), componente importante da membrana externa das bactérias gram-negativas, são potentes ativadores de macrófagos, levando à produção de citocinas como IL-12, TNF-α e de intermediários de oxigênio/nitrogênio (Meng *et al*. 1997; Boehm *et al.,* 1997). A estimulação dos macrófagos com IFN-γ e LPS aumenta também a sua atividade quimiotática e fagocítica (Amura *et al.,* 1998) que em conjunto com a produção de mediadores inflamatórios promovem a ativação destas células.

Para avaliar o efeito das nanocápsulas sobre a produção de NO e citocinas, primeiramente foi necessário padronizar a concentração de estímulo a ser utilizada. Assim, as células J774.A1 foram estimuladas com diferentes concentrações de LPS e/ou IFN-γ por 24 horas. Após este tempo, foi

observado que a concentração de 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ foi capaz de estimular a produção de NO e citocinas, sem causar citotoxicidade (dados não mostrados).

Para avaliar o efeito das nanocápsulas sobre a produção de óxido nítrico, as células J774-A1 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações das nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) na presença ou ausência de estímulo (25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ) e de soro fresco de camundongos BALB/c. A determinação da produção de NO no sobrenadante da cultura celular foi avaliada pelo método de Griess (Green *et al.*, 1982).

Na ausência de estímulo, as nanocápsulas, mesmo na presença do soro, não tiveram efeito sobre a produção de NO. Na presença de estímulo, as nanocápsulas de PLA, nas concentrações de 1000 e 125µg/mL induziram uma redução significativa na produção de NO pelas células J774.A1 (Figura 10-A). Na presença do soro de camundongos BALB/c, a redução na produção de NO por essas nanocápsulas pôde ser observada em todas as concentrações testadas (Figura 10-B).

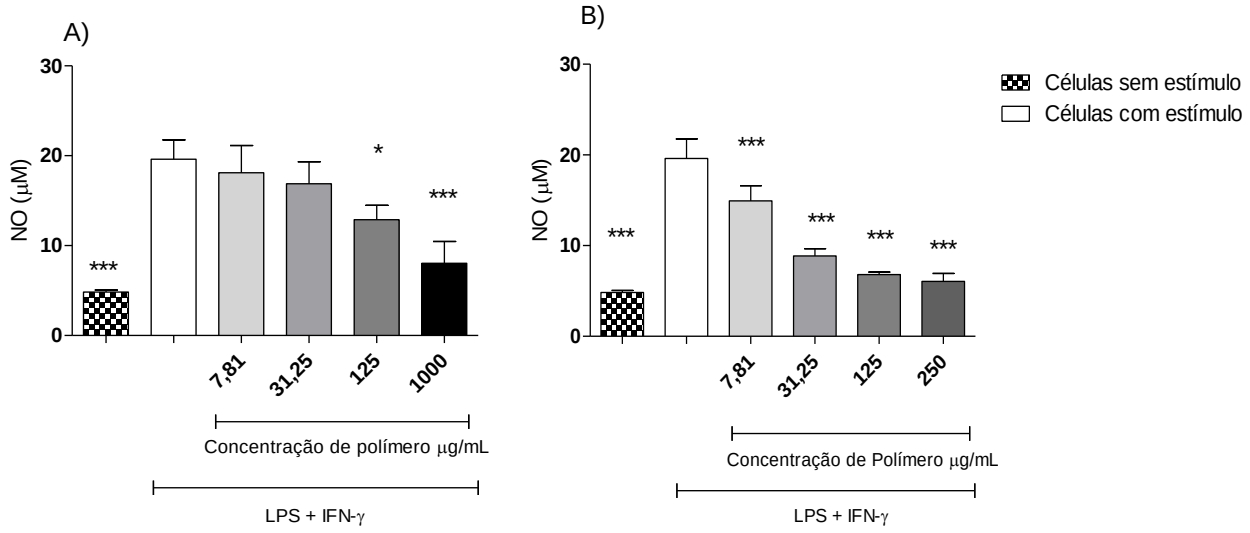

Figura 10. Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a produção de NO por macrófagos estimulados com LPS/IFN-γ. A) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA por 24 h. B) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com soro fresco de BALB/c e diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA por 24 h. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 e ***P < 0,001 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas.

De acordo com a Figura 11-A é possível observar que as nanocápsulas de PLA-PEG na concentração de 1000 µg/mL reduziram significativamente a produção de NO pelas células estimuladas. Esta diminuição foi observada na presença do soro de BALB/c, nas concentrações de 250, 125 e 31,25 µg/mL.(Figura 11-B).

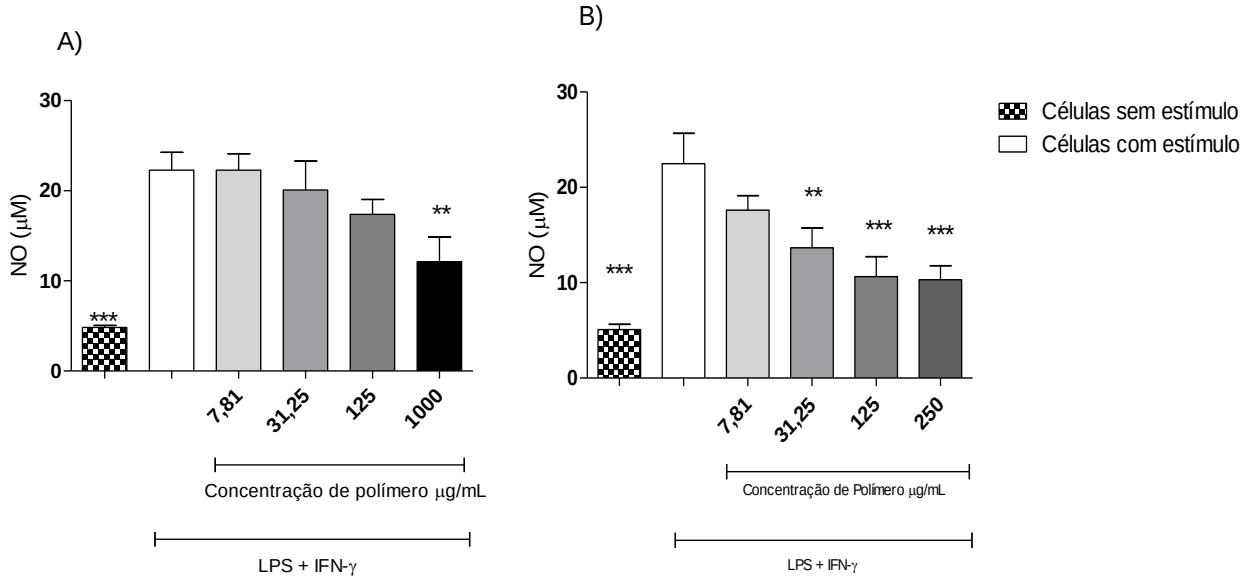

Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de NO por macrófagos estimulados com LPS/IFN-γ. A) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG por 24h. B) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com soro fresco de BALB/c e diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG por 24h. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). **P < 0,01 e ***P < 0,001 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas.

As nanocápsulas de PLA-QUI, na concentração de 10 µg/mL, promoveram um aumento significativo na produção de NO pelas células estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ (Figura 12-A). Essas nanocápsulas na concentração de 5 µg/mL e na presença do soro de BALB/c também induziram aumento na produção de NO (Figura 12-B).

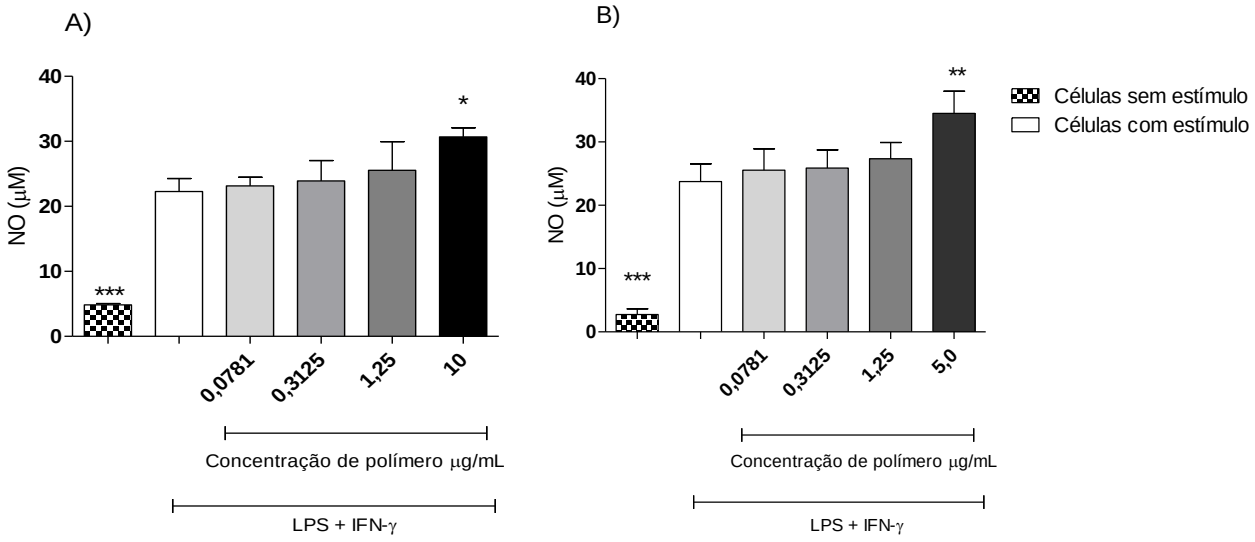

Figura 12. Efeito de diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de NO por macrófagos estimulados com LPS/IFN-γ. A) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI por 24h. B) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com soro fresco de BALB/c e diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI por 24h. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas.

4.4. Determinação da produção de TNF-α e IL-10

Visando investigar o efeito das nanocápsulas sobre a resposta de células J774.A1, foi avaliada a produção das citocinas IL-10 e TNF-α. As células foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de nanocápsulas (PLA, PLA-PEG ou PLA-QUI) na presença e na ausência de estímulo (25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ) e de soro fresco de camundongos BALB/c.

As nanocápsulas, na presença e na ausência do soro, não tiveram efeito sobre a produção de TNF-α e IL-10 pelas células não estimuladas (dados não mostrados). A análise estatística demonstra que as nanocápsulas de PLA na concentração de 1000 e 125 μg/mL promoveram aumento significativo da produção de IL-10 pelas células J774.A1 estimuladas (Figura 13-A). Na presença do soro de BALB/c, as nanocápsulas de PLA nas concentrações de 250, 125 e 31,25 μg/mL também provocaram aumento na produção de IL-10 (Figura 13-B).

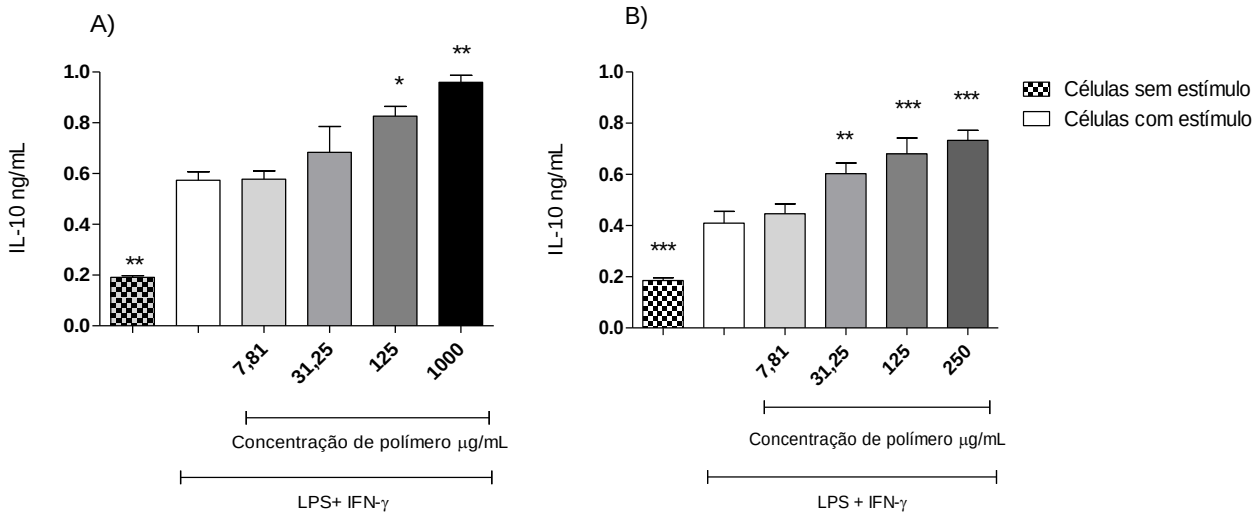

Figura 13. Efeito de nanocápsulas de PLA sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. A) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA por 24h. B) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com soro fresco de BALB/c e diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão) * P < 0,05, ** P < 0,01 e ***P < 0,001em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas.

Na ausência de soro, as nanocápsulas de PLA na concentração de 1000 μg/mL induziram uma redução significativa na produção de TNF-α pelas células J774.A1 estimuladas com LPS e IFN-γ (Figura 14-A). Na presença de soro de BALB/c, concentrações menores dessas nanocápsulas foram capazes de reduzir a produção de TNF-α pelas células estimuladas (Figura 14-B).

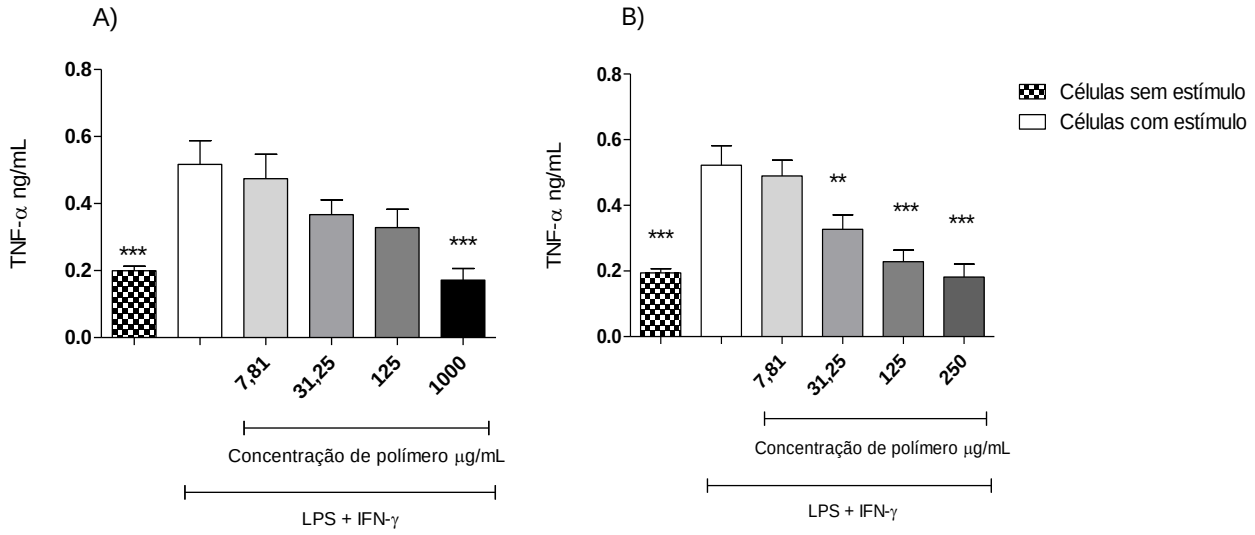

Figura 14. Efeito de nanocápsulas de PLA sobre a produção de TNF-α por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. A) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA por 24h. B) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com soro fresco de BALB/c e diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA por 24h.Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). **P<0,01 e ***P<0,001 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas.

Na ausência de soro, as nanocápsulas de PLA-PEG não tiveram efeito sobre a produção de IL-10 pelas células J774.A1estimuladas (figura 15-A). No entanto, na presença do soro de BALB/c essas nanopartículas na concentração de 250 μg/mL apresentaram a capacidade de induzir aumento significativo na produção dessa citocina (Figura 15-B).

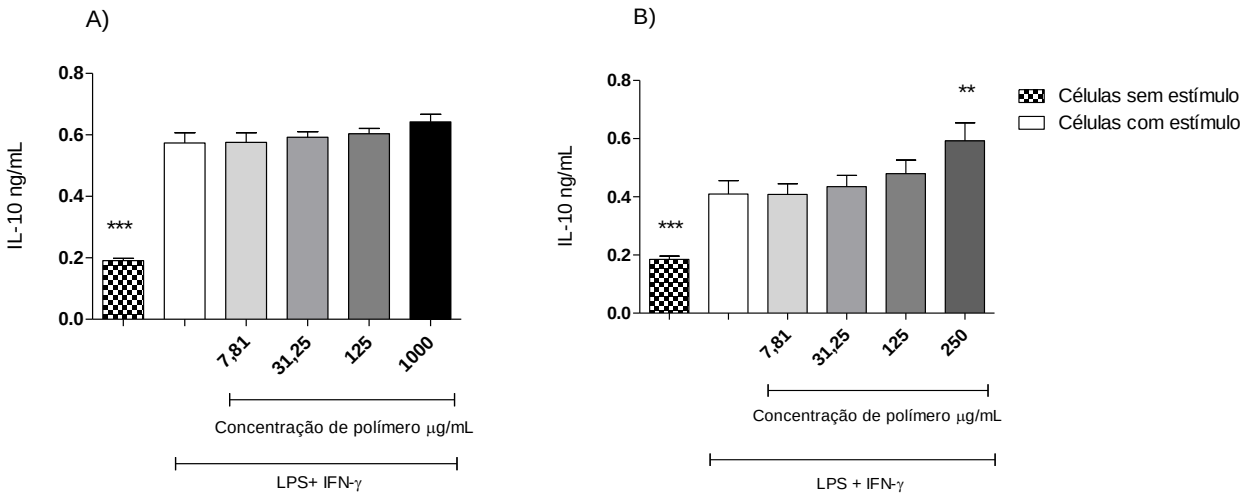

Figura 15. Efeito de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. A) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG por 24h. B) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com soro fresco de BALB/c e diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). **P < 0,01 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas.

De acordo com a Figura 16-A observa-se que as nanocápsulas de PLA-PEG, na concentração de 1000 µg/mL, promoveram significativa diminuição na produção de TNF-α pelas células estimuladas. O mesmo pode ser observado para essas nanocápsulas nas concentrações de 250 e 125 µg/mL na presença de soro de BALB/c (figura 16-B).

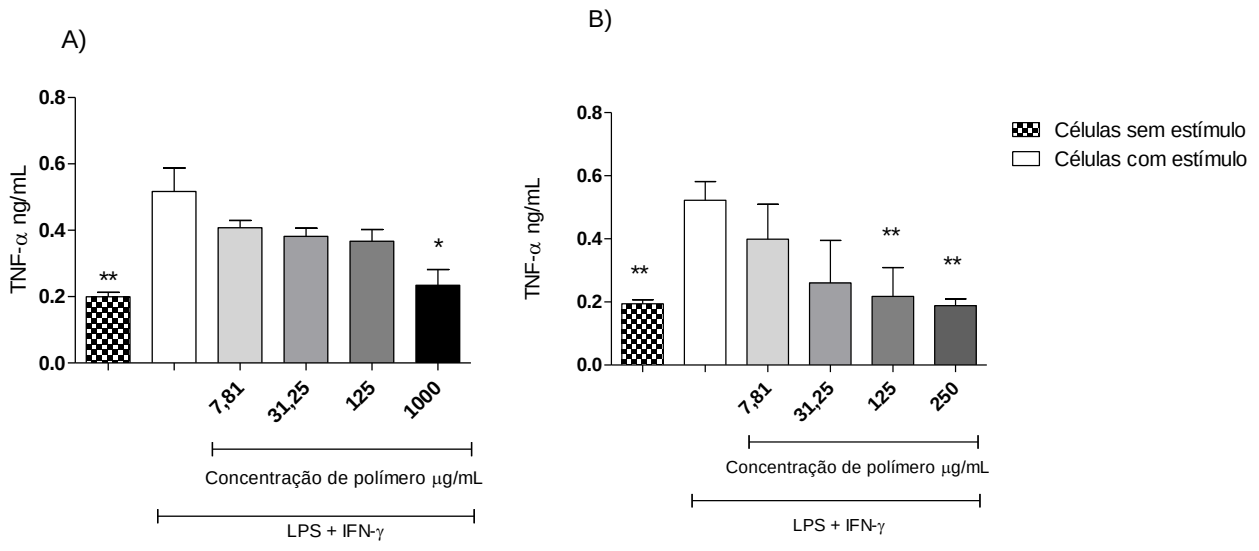

Figura 16. Efeito de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de TNF-α por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. A) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG por 24h. B) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com soro fresco de BALB/c e diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG por 24h Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 e ** P<0,01 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas.

De acordo com a análise estatística, as nanocápsulas de PLA-QUI não apresentaram efeito sobre a produção de IL-10 pelas células J774.A1 estimuladas (Figura 17-A). No entanto, na presença de soro de BALB/c, essas nanocápsulas na concentração de 5,0 μg/mL inibiram significativamente a produção de IL-10 pelas células estimuladas (Figura 17-B).

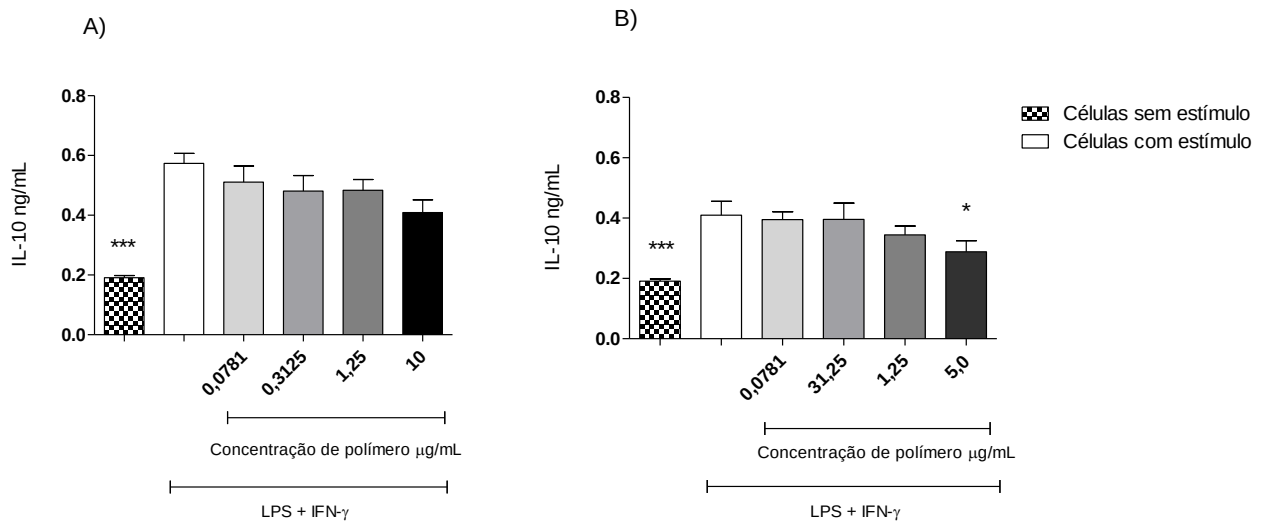

Figura 17. Efeito de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. A) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI por 24h. B) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com soro fresco de BALB/c e diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI por 24 h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 e ***P < 0,001 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas.

Com relação à produção de TNF-α, os dados estatísticos demonstram que as nanocápsulas de PLA-QUI, na concentração de 10 μg/mL, promoveram aumento significativo na produção desta citocina (Figura 18-A). O mesmo pode ser observado para as nanocápsulas de PLA-QUI (5 μg/mL) na presença de soro de BALB/c (Figura 18-B).

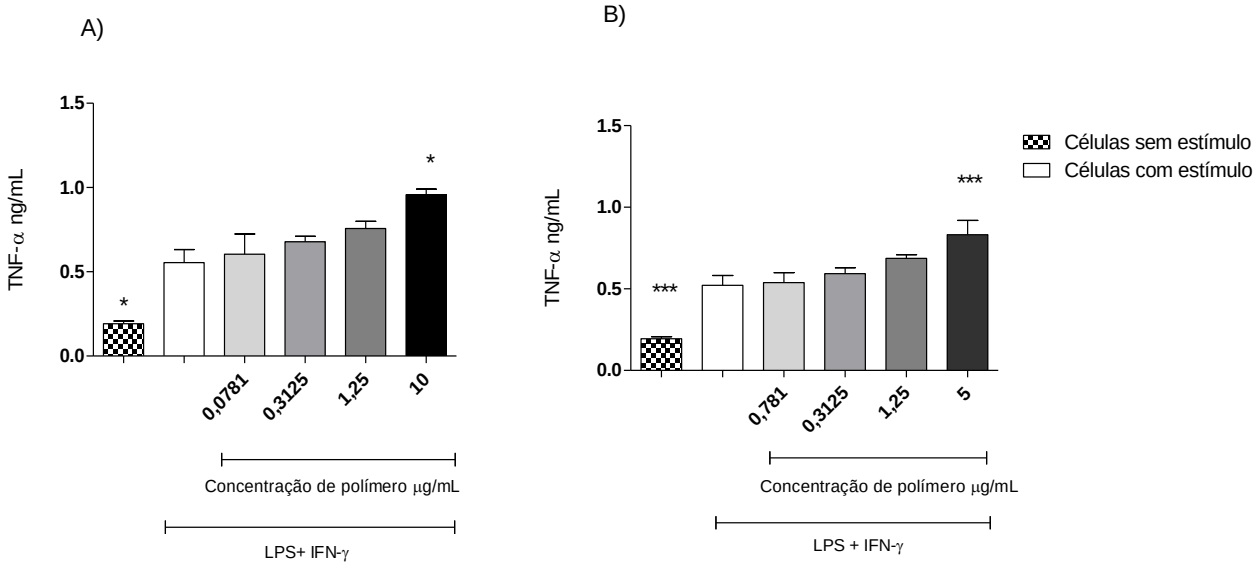

Figura 18. Efeito de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de TNF-α por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/IFN-γ. A) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI por 24h. B) As células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com soro fresco de BALB/c e diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 e ***P < 0,001 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas.

4.5. Avaliação da internalização das nanocápsulas pelas células J774.A1

4.5.1. Análise por microscopia confocal

Após avaliar o efeito das nanocápsulas sobre a viabilidade celular e sobre a produção de NO e citocinas, objetivou-se investigar a internalização das nanocápsulas pelas células J774.A1 em cultura. Para isso, foram realizados estudos de microscopia confocal com as nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) na presença de estímulo (25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ) e na presença e ausência de soro fresco de camundongos BALB/c. Foram escolhidas as concentrações mais altas e não citotóxicas para os macrófagos J774.A1 de cada uma das nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI).

Nestes experimentos, foram utilizadas nanocápsulas contendo ftalocianina de cloro e alumínio (AlClPC) como marcador fluorescente. Além disso, o núcleo das células J774.A1 foi marcado com DAPI.

A molécula de DAPI (4´,6 - diamidino-2-fenil-indol) é um marcador fluorescente que se liga fortemente à molécula de DNA das células. Essa molécula atravessa a membrana celular sem a danificá-la e é utilizada para visualizar os núcleos de células mortas ou vivas. Em microscopia de fluorescência, a molécula de DAPI absorve radiação em 358 nm e emite na faixa do espectro luminoso azul de 456-460 nm (Morikawa *et. al.*, 1981).

As ftalocianinas são pigmentos tetraazoindólicos análogos às porfirinas com forte absorção e emissão na faixa de espectro luminoso vermelho de 650-740 nm (Silva *et al.*, 2011).

A Figura 19 mostra uma imagem em microscopia confocal em que as células J774.1 foram cultivadas na ausência de nanocápsulas fluorescentes. A Figura 19-A corresponde ao campo de fluorescência da AlClPC e a Figura 19–B corresponde à sobreposição de imagens na qual pode ser observado o contorno celular em DIC (*Differential Interference Contrast*) e o núcleo celular marcado com DAPI (azul).

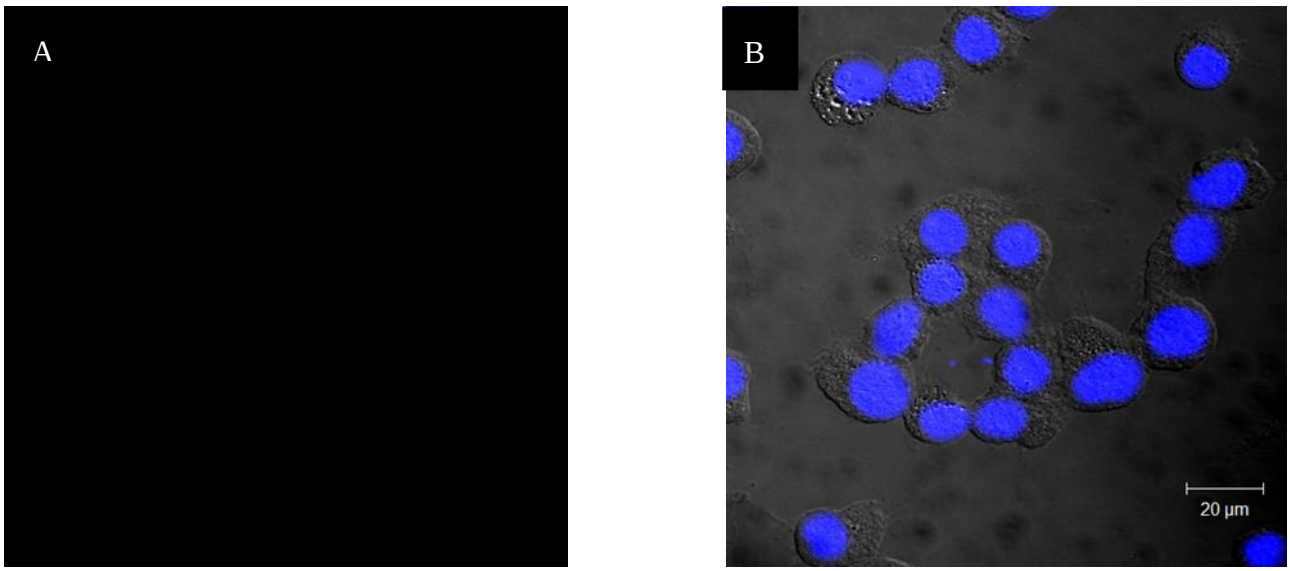

Figura 19. Imagem de microscopia confocal de células J774.A1 cultivadas na ausência de nanocápsulas. Em A, ausência de fluorescência da AlClPC. Em B, sobreposição de imagens na qual pode ser observado o núcleo celular marcado com DAPI (azul) e o contorno celular em DIC (*Differential Interference Contrast*).

De acordo com a Figura 20 é possível observar fluorescência dispersa no citoplasma celular, o que demonstra que as nanocápsulas de PLA na concentração de 1000 µg/mL sofreram internalização pelas células J774.A1. Na presença do soro de BALB/c, também foi observado a presença de nanocápsulas no interior das células , tanto dispersas no citoplasma quanto localizadas em vacúolos (Figura 21).

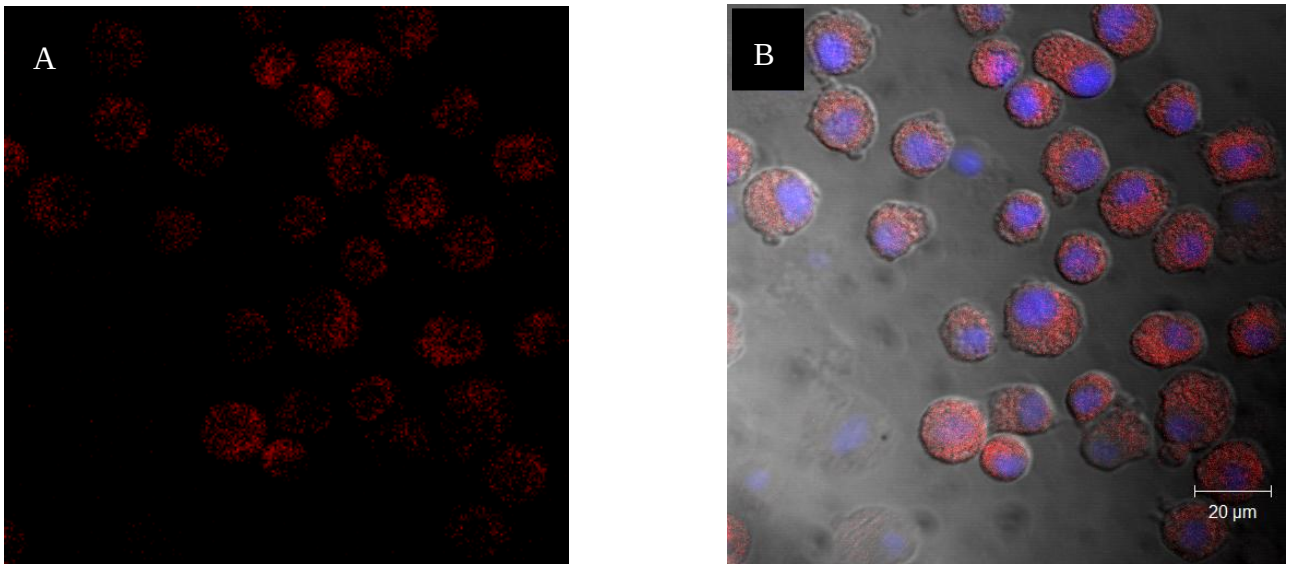

Figura 20. Imagem de microscopia confocal de células J774.A1 incubadas com nanocápsulas de PLA contendo o marcador fluorescente AlClPC (vermelho) encapsulado, na ausência de soro. Em A, fluorescência da ftalocianina dispersa no citoplasma. Em B, sobreposição de imagens na qual pode ser observado a ftalocianina (vermelho), o núcleo celular marcado com DAPI (azul) e o contorno celular em DIC (*Differential Interference Contrast*).

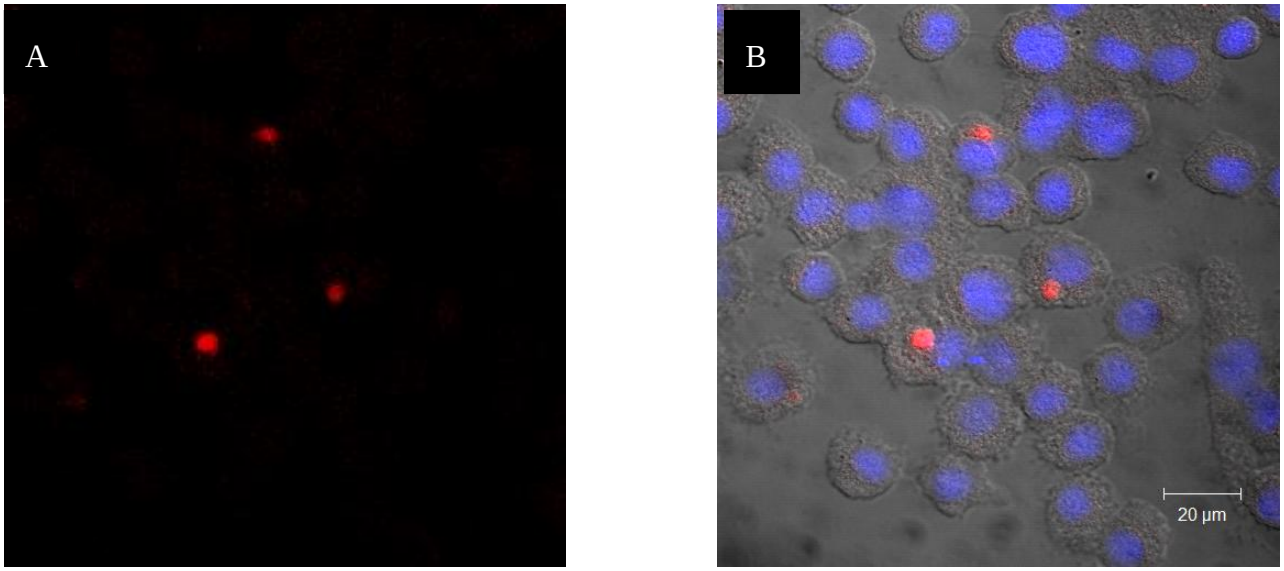

Figura 21. Imagens de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com soro fresco de camundongos BALB/c e nanocápsulas de PLA (250 µg/mL) contendo o marcador fluorescente AlClPC (vermelho) encapsulado. Em A, observamos fluorescência tanto dispersa, quanto concentrada em regiões específicas do citoplasma. Em B, sobreposição de imagens na qual pode ser observado a ftalocianina (vermelho), o núcleo celular marcado com DAPI (azul) e o contorno celular em DIC (*Differential Interference Contrast*).

De acordo com a Figura 22, é possível observar fluorescência dispersa no citoplasma celular, o que demonstra que as nanocápsulas de PLA-PEG sofreram internalização pelas células J774.A1 (Figura 22). Na presença do soro de BALB/c, observou-se a presença dessas nanocápsulas no interior das células, tanto dispersas no citoplasma quanto localizadas em vacúolos (Figura 23).

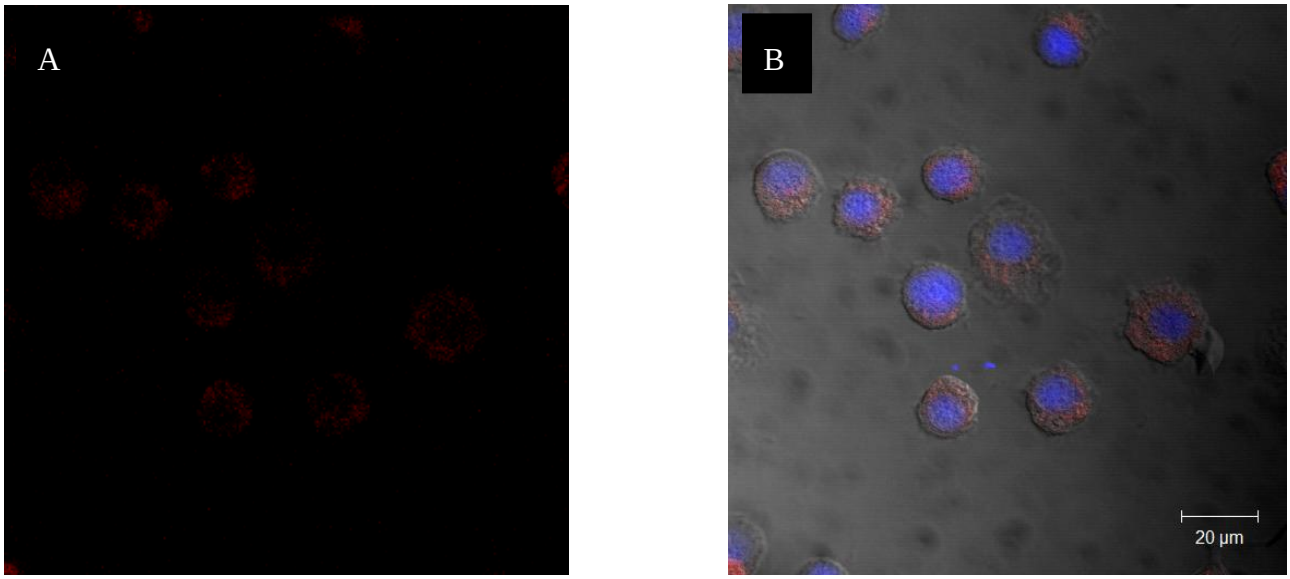

Figura 22. Imagem de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com nanocápsulas de PLA-PEG (1000 µg/mL), contendo o marcador fluorescente AlClPC (vermelho) encapsulado, na ausência de soro de camundongos BALB/c. Em A, fluorescência da ftalocianina dispersa no citoplasma. Em B, sobreposição de imagens na qual observamos a ftalocianina (vermelho), o núcleo celular marcado com DAPI (azul) e o contorno celular pode ser visualizado em DIC (Differential Interference Contrast).

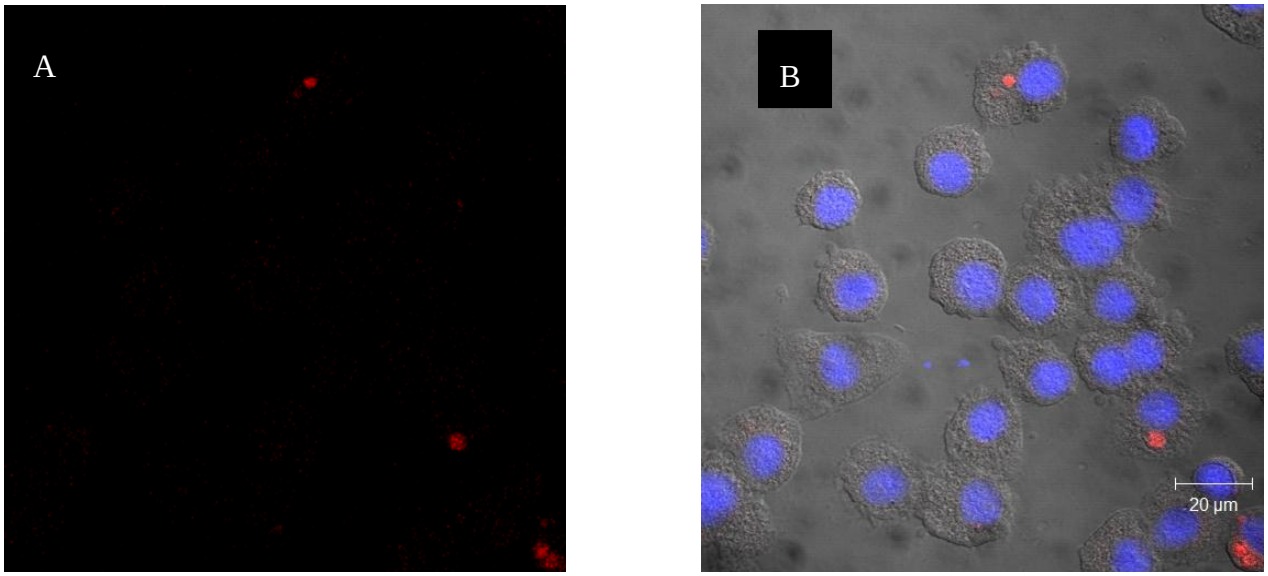

Figura 23. Imagem de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com soro fresco de camundongos BALB/c e nanocápsulas de PLA-PEG (250 µg/mL) contendo o marcador fluorescente AlClPC (vermelho) encapsulado. Em A, observamos fluorescência tanto dispersa, quanto concentrada em regiões específicas do citoplasma. Em B, sobreposição de imagens na qual observamos a ftalocianina (vermelho), o núcleo celular marcado com DAPI (azul) e o contorno celular pode ser visualizado em DIC (Differential Interference Contrast).

Ao avaliar a internalização de nanocápsulas de PLA-QUI pelas células, observou-se que na ausência e presença de soro de BALB/c (Figuras 24 e 25, respectivamente), não foi possível detectar a presença das nanocápsulas no interior das células.

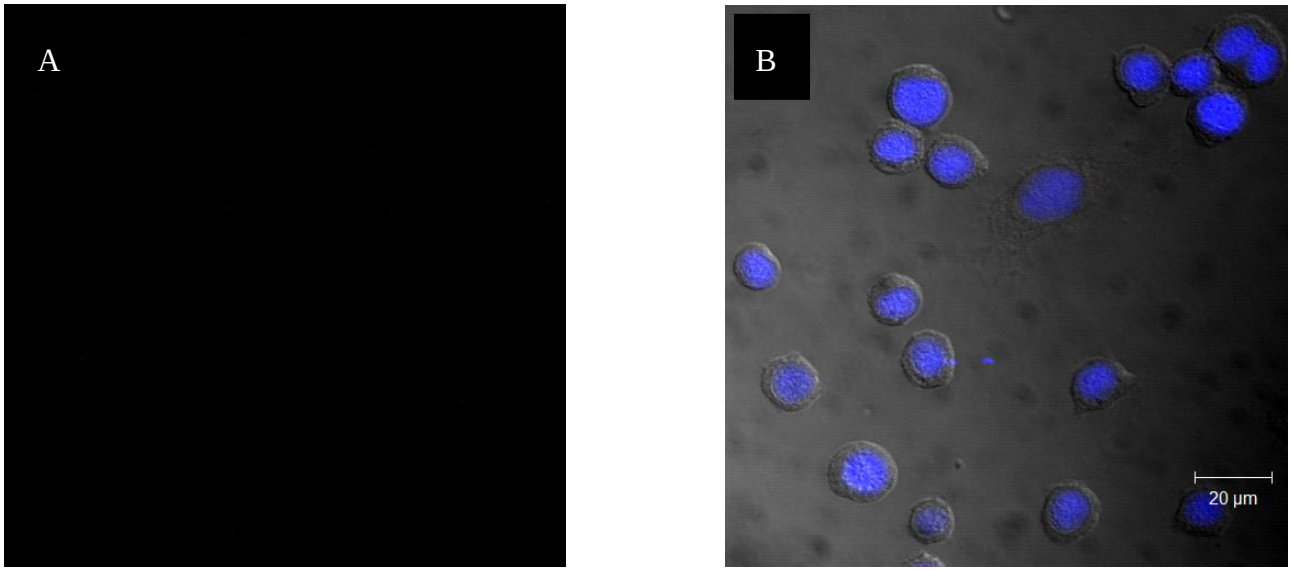

Figura 24. Imagem de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com nanocápsulas de PLA-QUI (10 µg/mL), contendo o marcador fluorescente AlClPC (vermelho) encapsulado, na ausência de soro de camundongos BALB/c. Em A, fluorescência da ftalocianina não foi observada. Em B, sobreposição das imagens de A as suas respectivas imagens de núcleo celular, marcado com DAPI (azul) e contorno celular, visualizado em DIC (Differential Interference Contrast).

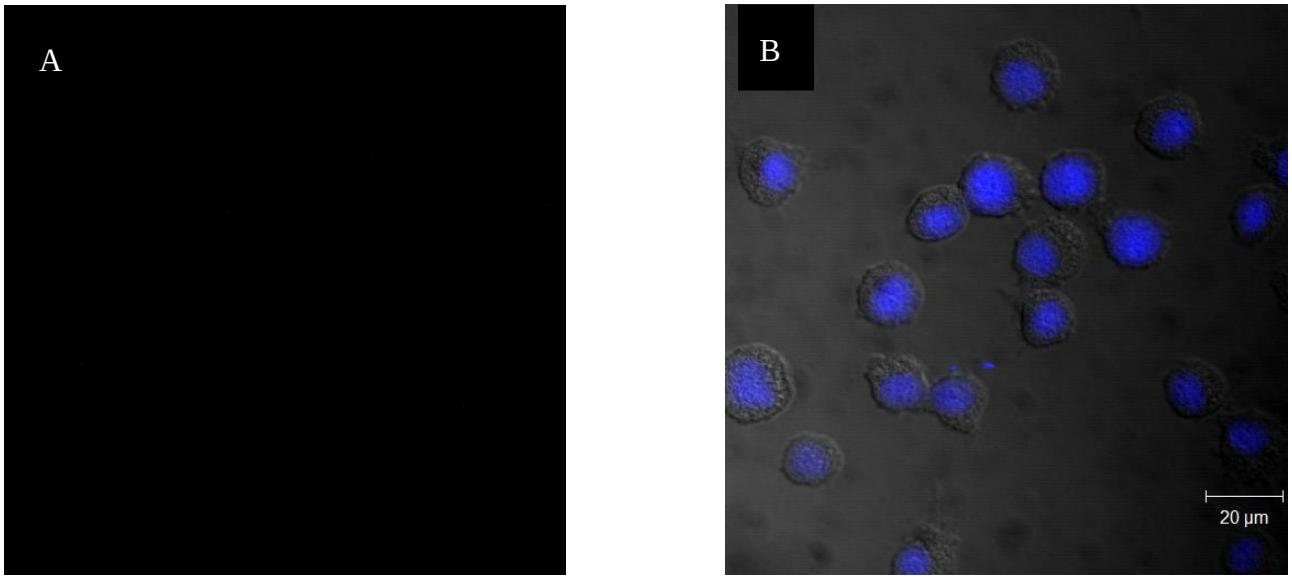

Figura 25. Imagem de fluorescência confocal de células J774.A1 incubadas por 24 horas com soro fresco de camundongos BALB/c e nanocápsulas de PLA-QUI (5 µg/mL) contendo o marcador fluorescente AlClPC (vermelho) encapsulado. Em A, fluorescência da ftalocianina não foi observada. Em B, sobreposição das imagens de A as suas respectivas imagens de núcleo celular, marcado com DAPI (azul) e contorno celular, visualizado em DIC (Differential Interference Contrast).

4.5.2. Análise quantitativa

Através da análise por CLAE, objetivou-se avaliar a porcentagem de internalização das nanocápsulas pelas células J774.A1 na presença e na ausência de soro de BALB/c. Foram escolhidas as concentrações de nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) mais altas e não citotóxicas para as células J774.A1.

As células J774.A1 foram estimuladas (25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ) e incubadas com as diferentes nanocápsulas, sendo que todas essas continham a mesma quantidade de ftalocianina de cloro e alumínio (AlClPC) encapsulada. A incubação foi realizada inicialmente por 24h e posteriormente por 4h.

O cromatograma do experimento de 24 horas apresentou dois picos demonstrando que pode ter ocorrido degradação do marcador AlClPC pela própria célula. Dessa forma, a quantificação da internalização das nanocápsulas se tornou inviável nesse tempo de incubação.

A análise estatística dos dados obtidos demonstra que após 4 horas de incubação, as nanocápsulas de PLA sofreram maior internalização pelas células J774.A1 do que as nanocápsulas de PLA-PEG e PLA-QUI, tanto na ausência como na presença de soro de BALB/c (Figura 26).

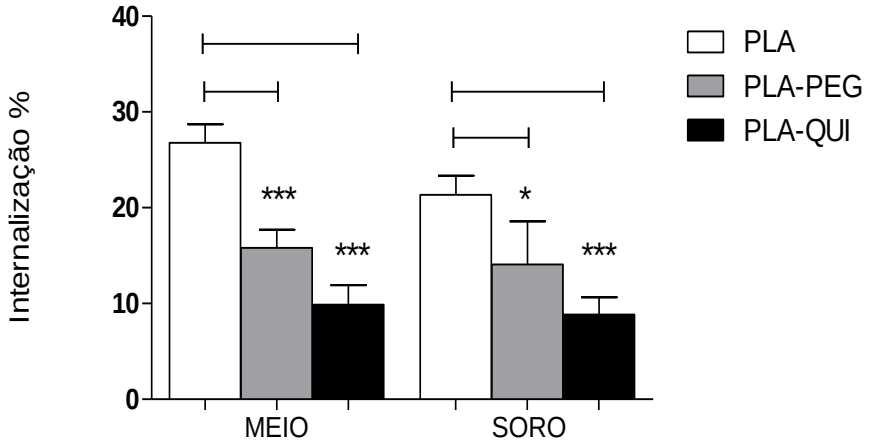

Figura 26. Histograma de quantificação da internalização das nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-CHI pelas células J774.A1 após 4 h de incubação, na ausência ou na presença de soro fresco de camundongos BALB/c, determinada por CLAE. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± dp (desvio padrão). * P <0.05e *** P <0.001comparado às células tratadas com nanocápsulas de PLA.

4.6. Avaliação do efeito do pré-tratamento com as nanocápsulas sobre a produção de NO

Com intuito de avaliar se o pré-tratamento com diferentes concentrações de nanocápsulas poderia influenciar a resposta imune de células J774.A1 a um determinado estímulo, foi realizada a dosagem de NO e citocinas (IL-10 e TNF-α).

Em relação à produção de NO, as células foram previamente incubadas por 24 horas com diferentes concentrações das nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) na presença e na ausência de soro fresco de camundongos BALB/c. Em seguida as células foram estimuladas ou não com 25 ng/mL de LPS e 25U/mL de IFN-γ por 24 horas.

O pré-tratamento com as nanocápsulas, na presença e na ausência de soro de BALB/c, não teve efeito sobre a produção de óxido nítrico (NO) pelas células J774.A1 não estimuladas (dados não mostrados).

A análise estatística demonstra que as nanocápsulas de PLA, na concentração de 1000 μg/mL, promoveram uma significativa redução na produção de NO pelas células estimuladas (Figura 27-A). Na presença do soro, é possível observar que concentrações menores dessas nanocápsulas provocaram uma diminuição significativa da produção de NO pelas células estimuladas (Figura 27-B).

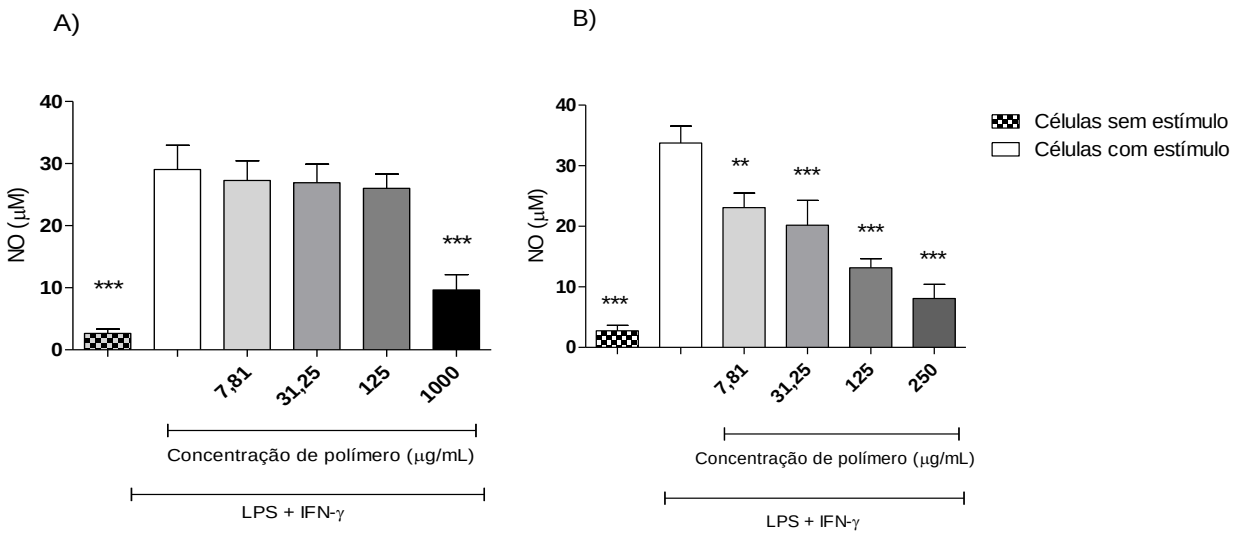

Figura 27. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a produção de NO. A) As células J774.A1 foram pré-incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA por 24h e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. B) As células J774.A1 foram pré-incubadas por 24h com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA na presença de soro fresco de camundongos BALB/c e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). **P < 0,01 e ***P < 0,001 em relação às células não tratadas e estimuladas.

As nanocápsulas de PLA-PEG, na concentração de 1000 μg/mL, promoveram redução da produção de NO pelas células estimuladas (Figura 28-A). Na presença de soro de BALB/c, essas nanocápsulas nas concentrações de 250 e 125 μg/mL também induziram diminuição da taxa de NO produzida pelas células J774.A1 estimuladas (Figura 28-B).

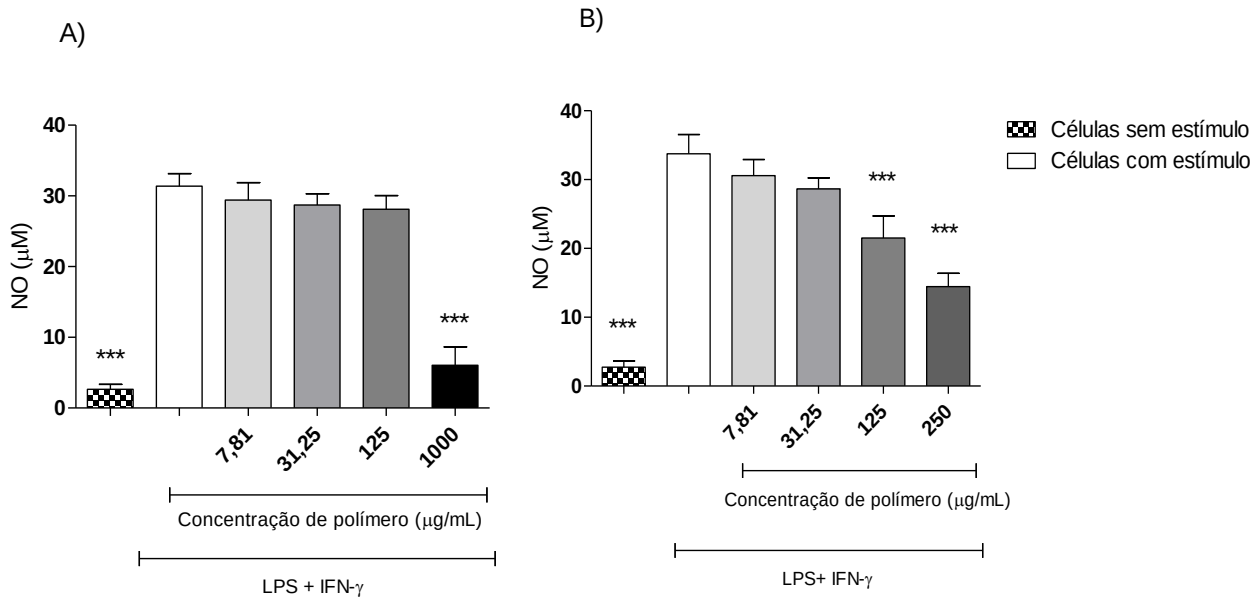

Figura 28. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de NO. A) As células J774.A1 foram pré-incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG por 24h e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. B) As células J774.A1 foram pré-incubadas por 24h com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG na presença de soro fresco de camundongos BALB/c e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão).***P < 0,001 em relação às células não tratadas e estimuladas.

Ao contrário do efeito observado para as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG, as nanocápsulas de PLA-QUI apresentaram a capacidade de promover aumento na produção de NO pelas células estimuladas (Figura 29-A). Esse aumento também foi observado para as nanocápsulas de PLA-QUI (5 μg/mL) na presença de soro de BALB/c (Figura 29-B).

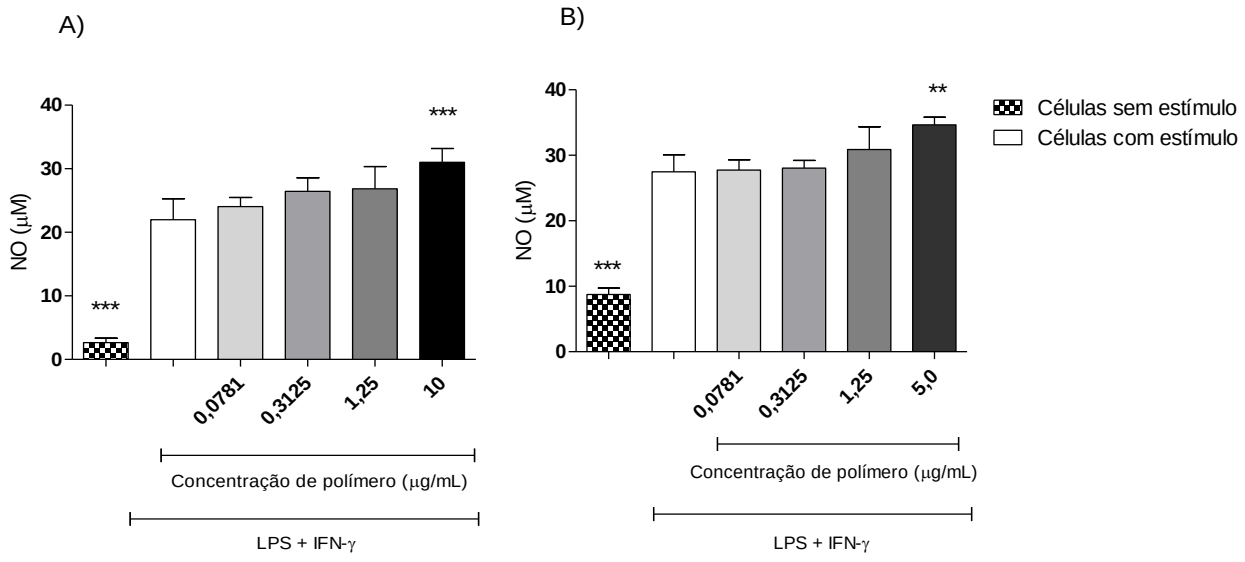

Figura 29. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de NO. A) As células J774.A1 foram pré-incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI por 24h e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. B) As células J774.A1 foram pré-incubadas por 24h com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI na presença de soro fresco de camundongos BALB/c e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). **P < 0,01 e ***P < 0,001 em relação às células não tratadas e estimuladas.

4.7. Avaliação do efeito do pré-tratamento com as nanocápsulas sobre a produção das citocinas IL-10 e TNF-α

Para avaliar o efeito do pré-tratamento de macrófagos J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas sobre a produção de IL-10 e TNF-α, as células foram pré-incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) na presença e na ausência de soro de camundongos BALB/c. Em seguida as células foram estimuladas ou não com 25ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24 horas.

As nanocápsulas, na presença ou não de soro de BALB/c, não apresentaram efeito sobre a produção de citocinas pelas células J774.A1 não estimuladas.

É possível observar pela análise estatística que as nanocápsulas de PLA na concentração de 1000 µg/mL, promoveram aumento da produção de IL-10 pelas células estimuladas (Figura 30-A). Na presença de soro, concentrações menores dessas nanopartículas apresentaram a capacidade de elevar a produção de IL-10 pelas células estimuladas (Figura 30-B). Com relação à produção de TNF-α, as nanocápsulas de PLA na concentração de 1000 µg/mL induziram diminuição significativa na produção desta citocina (Figura 31-A). A análise estatística demonstra que na presença de soro de BALB/c, as nanocápsulas de PLA, na concentração de 250 µg/mL, também promoveram redução na produção de TNF-α produzida pelas células estimuladas (Figura 31-B).

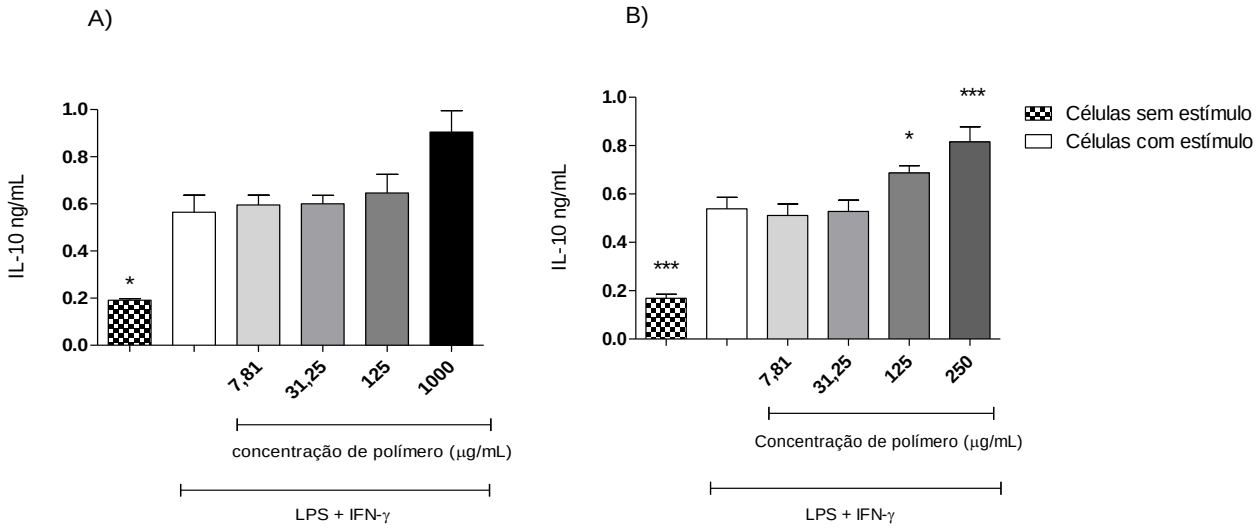

Figura 30. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a produção de IL-10. A) As células J774.A1 foram pré-incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA por 24h e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ por 24h. B) As células J774.A1 foram pré-incubadas por 24h com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA na presença de soro fresco de camundongos BALB/c e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). **P < 0,01 em relação às células não tratadas e estimuladas.

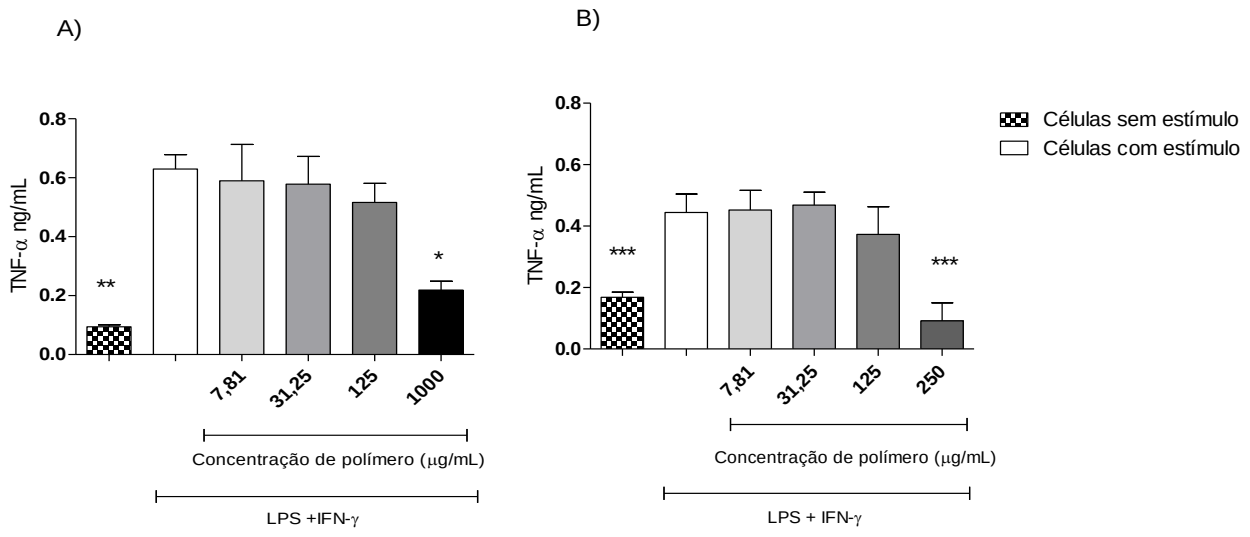

Figura 31. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA sobre a produção de TNF-α. A) As células J774.A1 foram pré-incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA por 24h e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ por 24h. B) As células J774.A1 foram pré-incubadas por 24h com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA na presença de soro fresco de camundongos BALB/c e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *** $P < 0,001$ em relação às células não tratadas e estimuladas.

As nanocápsulas de PLA-PEG não tiveram efeito sobre a produção de IL-10 pelas células estimuladas (Figura 32-A). No entanto, na presença do soro, essas nanocápsulas na concentração de 250 μg/mL apresentaram a capacidade de aumentar a produção de IL-10 pelas células estimuladas (Figura 32-B).

De acordo com os dados estatísticos obtidos, verifica-se que as nanocápsulas de PLA-PEG, na concentração de 1000 μg/mL reduziram a produção de TNF-α pelas células estimuladas com LPS e IFN-γ (Figura 33-A). A produção desta citocina também sofreu redução quando as células estimuladas foram incubadas com as nanocápsulas de PLA-PEG (concentração de 250 μg/mL) na presença de soro (Figura 33-B).

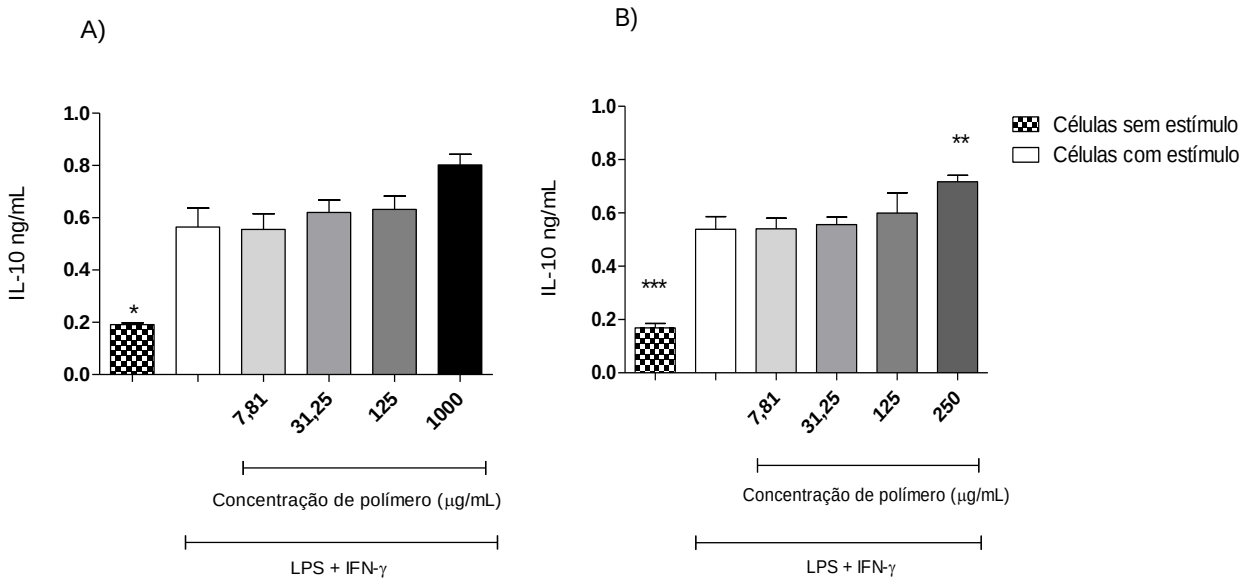

Figura 32. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de IL-10. A) As células J774.A1 foram pré-incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG por 24h e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ por 24h. B) As células J774.A1 foram pré-incubadas por 24h com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG na presença de soro fresco de camundongos BALB/c e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001 em relação às células não tratadas e estimuladas.

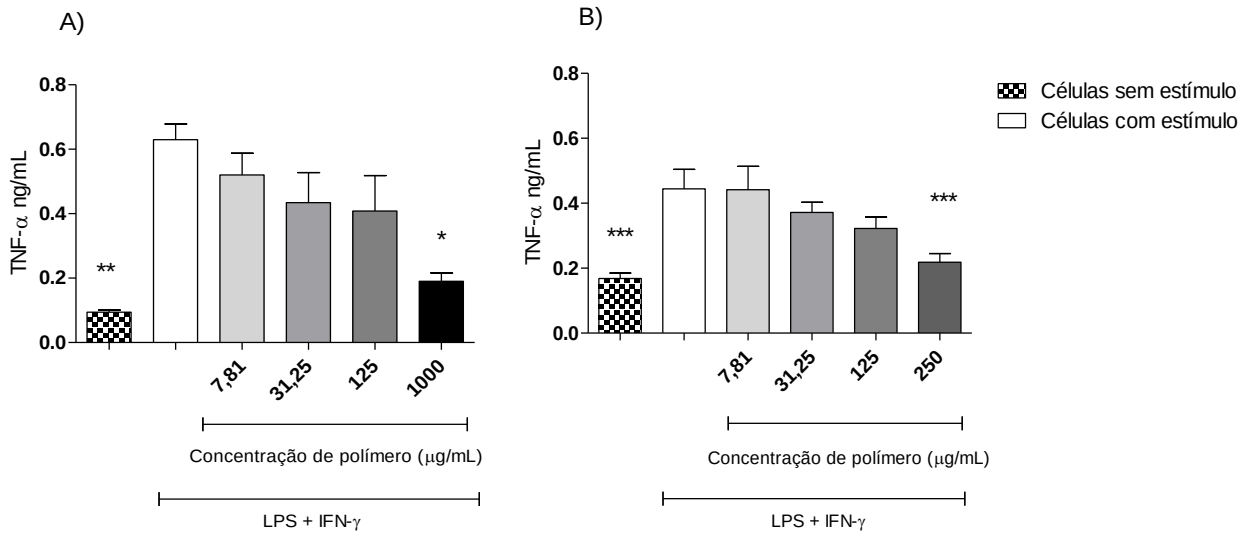

Figura 33. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de TNF-α. A) As células J774.A1 foram pré-incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG por 24h e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ por 24h. B) As células J774.A1 foram pré-incubadas por 24h com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-PEG na presença de soro fresco de camundongos BALB/c e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão) *P < 0,05, **P < 0,001 e ***P < 0,001 em relação às células não tratadas e estimuladas.

A análise estatística demonstra que as nanocápsulas de PLA-QUI não tiveram efeito sobre a produção da citocina IL-10 pelas células estimuladas (Figura 34-A). Porém, na presença de soro de BALB/c, essas nanocápsulas na concentração de 5 mg/mL promoveram redução dessa citocina (Figura 34-B).

As nanocápsulas de PLA-QUI, na concentração de 10 μg/mL, aumentaram a produção de TNF-α pelas células estimuladas com LPS + IFN-γ (Figura 35-A). Quando as células estimuladas foram incubadas com soro de BALB/c, as nanocápsulas de PLA-QUI na concentração de 5 μg/mL também induziram aumento na taxa de TNF-α produzida (Figura 35-B).

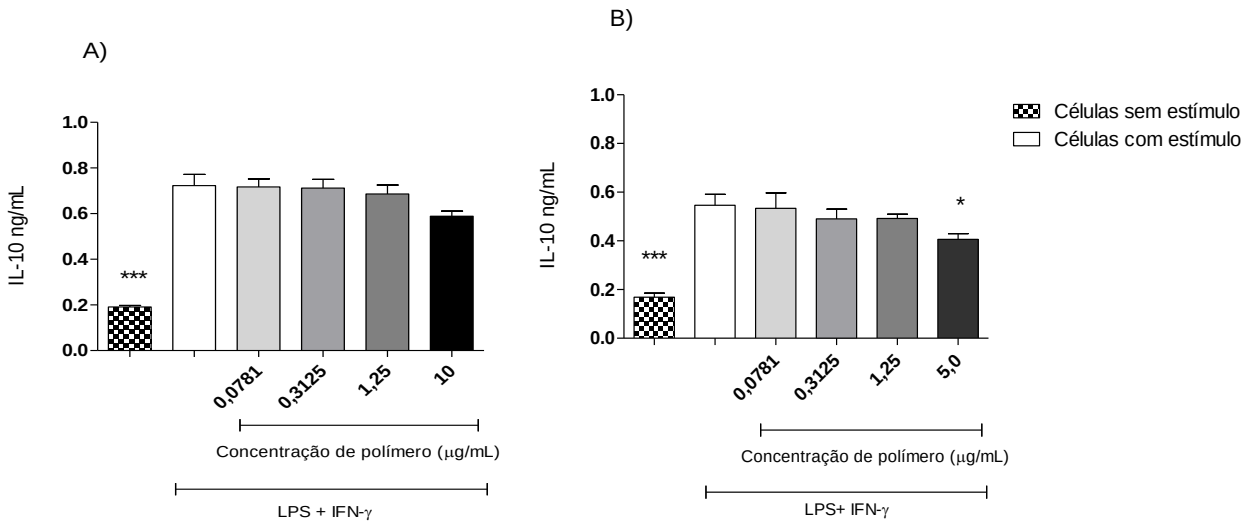

Figura 34. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de IL-10. A) As células J774.A1 foram pré-incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI por 24h e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ por 24h. B) As células J774.A1 foram pré-incubadas por 24h com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI na presença de soro fresco de camundongos BALB/c e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 e ***P < 0,001 em relação às células não tratadas e estimuladas.

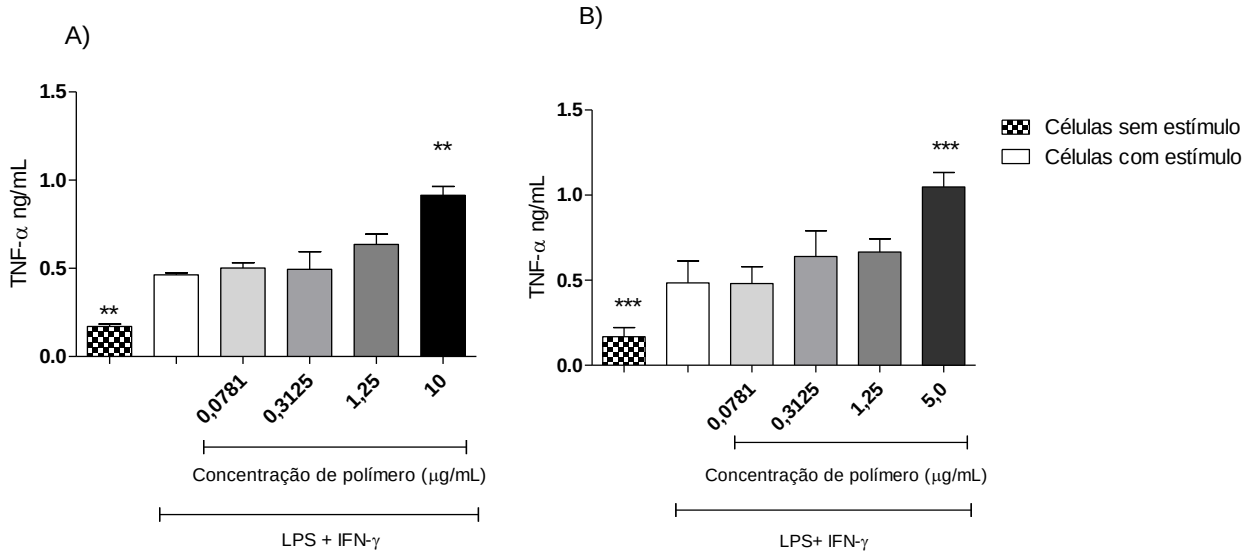

Figura 35. Efeito do pré-tratamento de células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de TNF-α. A) As células J774.A1 foram pré-incubadas com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI por 24h e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS + 25 U/mL de IFN-γ por 24h. B) As células J774.A1 foram pré-incubadas por 24h com diferentes concentrações de nanocápsulas de PLA-QUI na presença de soro fresco de camundongos BALB/c e em seguida foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). **P < 0,01 e ***P < 0,001em relação às células não tratadas e estimuladas.

4.8. Avaliação do efeito das nanocápsulas sobre a carga parasitária de macrófagos J774.A1 infectados com *L. infantum*

Como foi observado que as nanocápsulas apresentam efeito sobre a resposta imune de células J774.A1, foi avaliado qual seria o efeito dessas nanocápsulas sobre a carga parasitária de macrófagos infectados com *L. infantum*.

As células J774-A1 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) na presença e na ausência de estímulo (25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ) e de soro fresco de camundongos BALB/c.

Na ausência de estímulo, as nanocápsulas, mesma na presença de soro de BALB/c, não tiveram efeito sobre a porcentagem de células infectadas e sobre o número de amastigotas por macrófagos (dados não mostrados).

Na ausência de soro, observa-se que as nanocápsulas não tiveram efeito sobre a porcentagem de macrófagos estimulados e infectados com *L. infantum* (Figura 36-A) e também não promoveram alteração no número de amastigotas por macrófago infectado (Figura 36-B).

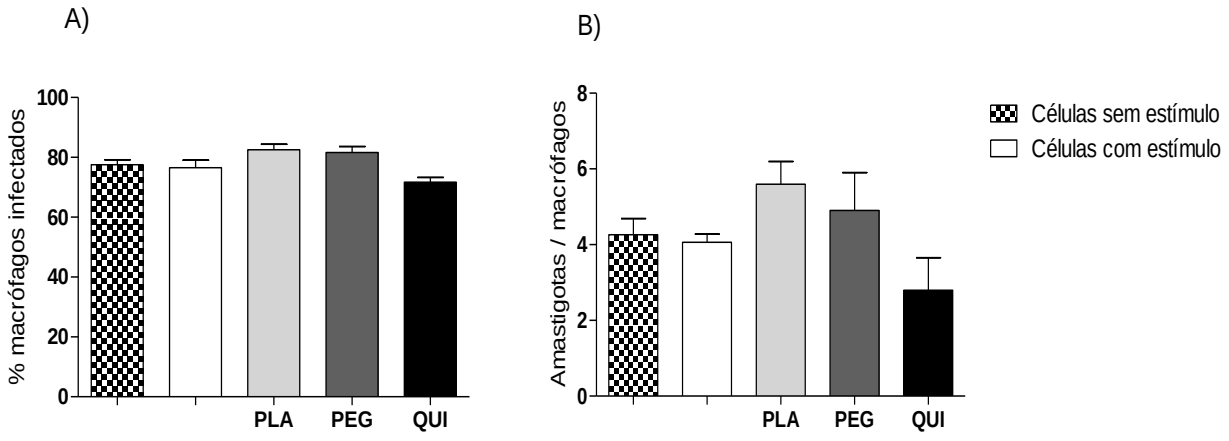

Figura 36. Efeito das nanocápsulas de PLA (1000 µg/mL), PLA-PEG (1000 µg/mL) e PLA-QUI (10 µg/mL) sobre a porcentagem de macrófagos J774.A1 infectados por *Leishmania infantum* (A) e sobre o número de amastigotas por macrófago (B). Após infecção, as células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com as nanocápsulas na presença de soro fresco por 24h. O controle corresponde às células J774.A1 infectadas incubadas na presença de meio e estímulo. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 em relação às células não tratadas e estimuladas.

A análise estatística demonstrou que as nanocápsulas de PLA (250 µg/mL) e PLA-PEG (250 µg/mL), na presença de estimulo e de soro de BALB/c, promoveram aumento do número de macrófagos infectados com *L. infantum* (Figura 37-A). Além disso, as nanocápsulas de PLA (250 µg/mL) provocaram aumento no número de amastigotas por macrófago infectado (Figura 37-B). As nanocápsulas de PLA-QUI não tiveram efeito sobre esses parâmetros analisados (Figura 37).

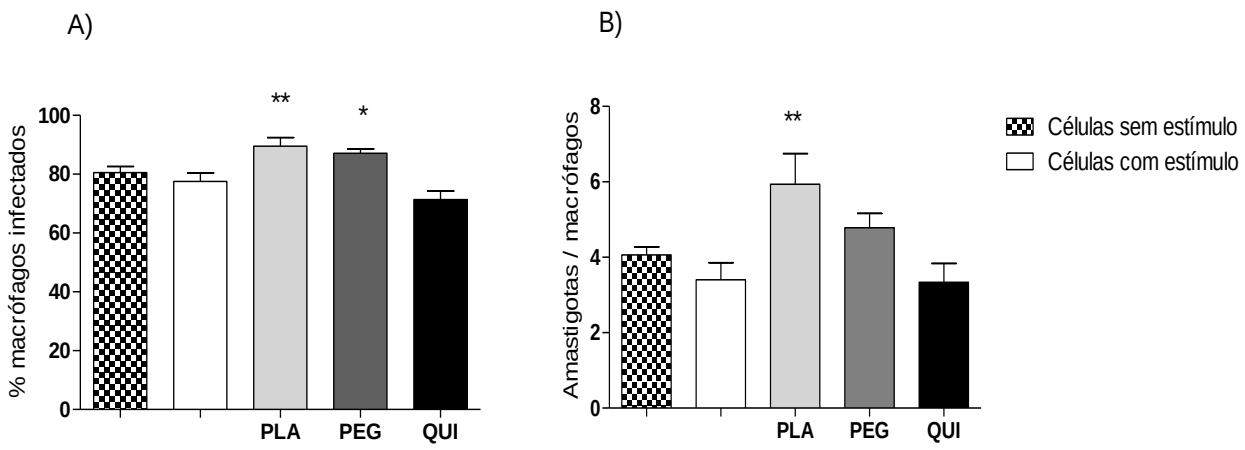

Figura 37. Efeito das nanocápsulas de PLA (250 µg/mL), PLA-PEG (250 µg/mL) e PLA-QUI (5 µg/mL) na presença de soro fresco de BALB/c sobre a porcentagem de macrófagos J774.A1 infectados por *Leishmania infantum* (A) e sobre o número de amastigotas por macrófago (B). Após infecção, as células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com as nanocápsulas na presença de soro fresco por 24h. O controle corresponde às células J774.A1 infectadas incubadas na presença de meio e estímulo. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05, **P < 0,01 em relação às células não tratadas e estimuladas.

4.9. Avaliação do efeito das nanocápsulas sobre a produção de NO e de citocinas (IL-10 e TNF-α) por macrófagos J774.A1 infectados com *L. infantum*

Visando investigar mais profundamente a capacidade das nanocápsulas em modular a resposta imune de macrófagos infectados com *L. infantum*, foi avaliada a produção de NO e citocinas (IL-10 e TNF-α). Para isso, as células J774-A1 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de nanocápsulas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) na presença e na ausência de estímulo e de soro fresco de camundongos BALB/c.

De acordo com a análise estatística, as nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI na presença e na ausência de estímulo e soro, não tiveram efeito sobre a produção de NO pelas células infectadas com *L. infantum* (dados não mostrados).

As nanocápsulas de PLA e PLA-PEG, na presença de soro de BALB/c, foram capazes de induzir o aumento significativo da produção de IL-10 pelas células infectadas (Figura 38 e Figura

39). No entanto, as nanocápsulas de PLA-QUI não tiveram efeito sobre a produção de IL-10 pelas células infectadas (Figura 40).

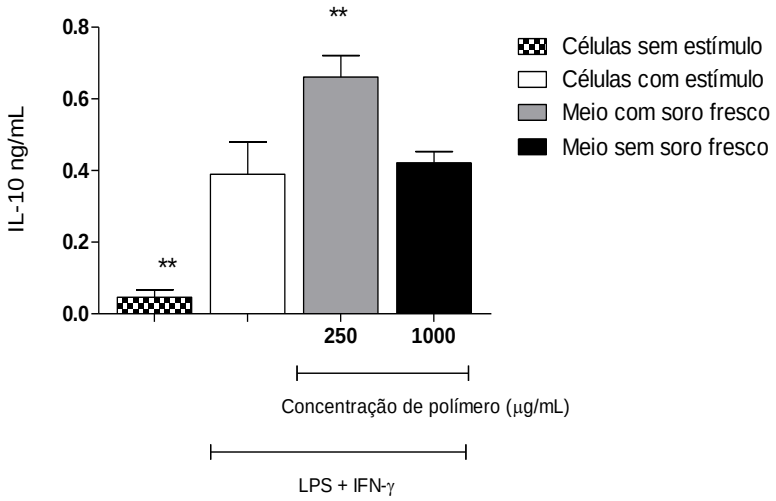

Figura 38. Efeito da nanocápsulas de PLA sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com *Leishmania infantum*. Após infecção, as células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com nanocápsulas de PLA, na presença ou ausência de soro de camundongos BALB/c, por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). **P < 0,01 em relação às células não tratadas e estimuladas.

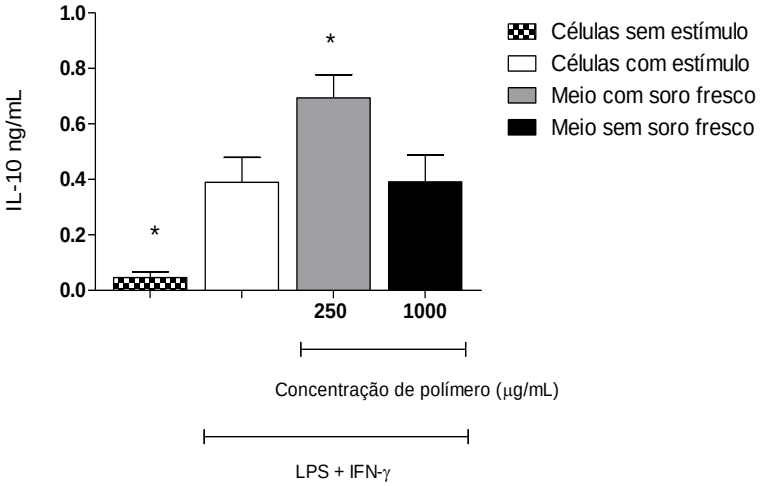

Figura 39. Efeito da nanocápsulas de PLA-PEG sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com *Leishmania infantum*. Após infecção, as células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com nanocápsulas de PLA-PEG, na presença ou ausência de soro de camundongos BALB/c, por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 em relação às células não tratadas e estimuladas.

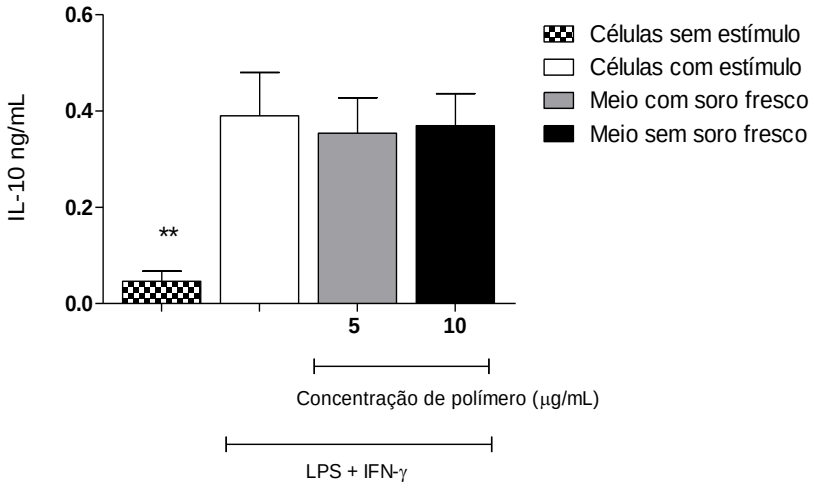

Figura 40. Efeito da nanocápsulas de PLA-QUI sobre a produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com *Leishmania infantum*. Após infecção, as células J774.A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN-γ e incubadas com nanocápsulas de PLA-QUI, na presença ou ausência de soro de camundongos BALB/c, por 24h. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média ± d.p. (desvio padrão). **P < 0,01 em relação às células não tratadas e estimuladas.

Com relação à produção de TNF-α, as nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI não apresentaram efeito sobre a produção desta citocina pelas células infectadas (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A influência da modificação da solubilidade, tamanho, composição química e característica superficial de nanocápsulas sobre a sua biocompatibilidade e biodistribuição no organismo já é bem conhecida (McNeil, 2005). No entanto, o efeito dessas propriedades sobre o sistema imunológico ainda foi pouco explorado (Dobrovolskaia & McNeil 2007). É importante lembrar, além do enfoque terapêutico, que muitos compostos podem estimular a liberação de mediadores imunológicos em altos níveis, causando alterações teciduais e vasculares ao organismo (Chi *et al.*, 2003).

O sistema imunológico é um mecanismo complexo de defesa do organismo. Dessa forma, o efeito dos nanocarreadores sobre propriedades imunomodulatórias pode ser avaliado através de ensaios de estimulação da imunidade inata, como por exemplo, a produção de citocinas e outras substâncias pelos macrófagos (Dobrovolskaia & McNeil 2007). O estudo utilizando macrófagos apresenta-se de forma interessante, uma vez que esses constituem um dos principais componentes do sistema imunológico, sendo as primeiras células a serem ativadas para participarem da resposta imune quando o organismo é confrontado por fatores exógenos de diferentes origens (Forman & Torres, 2001).

Assim, os experimentos realizados neste trabalho tiveram por finalidade avaliar se as nanocápsulas poliméricas (PLA, PLA-PEG e PLA-QUI) com diferentes características superficiais poderiam ter um efeito modulador sobre a resposta imune de macrófagos. Para a determinação deste efeito, o estabelecimento de concentrações ideais dessas nanocápsulas para o tratamento dos macrófagos se fez necessária, já que doses altas podem causar danos à viabilidade celular.

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O princípio deste ensaio consiste na absorção do sal MTT pelas células, o qual é reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan. Este produto de coloração púrpura é acumulado dentro da célula e pode ser quantificado por uma análise espectrofotométrica (Mosmann *et al.*, 1983).

A adição de soro fresco de camundongos BALB/c ao meio de incubação dos experimentos teve por objetivo mimetizar o ambiente "*in vivo*", no qual existem importantes componentes como as imunoglobulinas e proteínas do complemento. Além disso, os macrófagos J774.A1 são uma linhagem de células tumorais obtidas de camundongos BALB/c, logo acredita-se que a utilização de soro fresco obtido da mesma espécie pode ter uma contribuição significativa sobre a ação dessas nanocápsulas sobre as células.

Na ausência de soro, verificou-se que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG não promoveram citotoxicidade sobre as células J774.A1, situando-se os valores de viabilidade próximos a 100%. Esses dados se assemelham aos achados de Mosqueira *et al.,* (1999) e Essa *et al.,* (2001). No entanto, na presença de soro de BALB/c, a viabilidade celular sofreu uma redução significativa nas células incubadas com as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG. Dessa forma, acredita-se que a presença de soro fresco de camundongos BALB/c no meio de incubação pode ter promovido a internalização das nanocápsulas pelas células através de uma via diferenciada, desencadeando assim redução da viabilidade celular.

Dentre as nanocápsulas avaliadas, as nanocápsulas de PLA-QUI foram as mais tóxicas para as células J774.A1. Acredita-se que o efeito tóxico dessas nanopartículas seja decorrente da presença da quitosana, uma vez que os resultados demonstraram que a quitosana pura foi muito tóxica para as células J774.A1.Alguns estudos demonstraram que as nanopartículas de quitosana, por apresentarem carga positiva, possuem grande afinidade pelas cargas negativas dos componentes da membrana celular e possivelmente sua toxicidade pode estar relacionada a essa interação iônica (Qi *et al.,* 2004). Além disso, microesferas e nanopartículas de quitosana podem provocar um efeito inibitório dose-dependente sobre a proliferação de várias linhagens de células tumorais, o que confirma os resultados obtidos para as nanocápsulas de PLA-QUI (Carreno-Gomez *et al*.,1997, Qi *et al.,* 2004, Qi *et al.,* 2005, Qi *et al.,*2006). Oliveira *et al.,* (2009) também observaram que doses altas de nanocápsulas de PLA-QUI apresentaram alta toxicidade após administração intravenosa em camundongos *SWISS.*

O processo de ativação de macrófagos provoca a produção de citocinas e NO, os quais estão diretamente envolvidos na resposta imune (Song *et al.,* 2002). Assim, a avaliação do efeito das nanocápsulas sobre estes parâmetros se fez muito importante.

O óxido nítrico (NO) é muito importante para a função do sistema imune, desempenhando um papel chave na atividade de macrófagos e defesas celulares contra patógenos intracelulares (Durner *et al.,* 1999). Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica dependendo da concentração ou depuração tecidual (Flora Filho *et al.,*2000).

No presente trabalho, observou-se que na ausência de estímulo, as nanocápsulas, mesmo na presença do soro, não tiveram efeito sobre a produção de NO e de citocinas (IL-10 e TNF-α).

Nos experimentos com estímulo, a análise estatística demonstrou que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG induziram uma redução significativa na produção de NO pelas células. Na

presença de soro de BALB/c, concentrações menores das nanocápsulas de PLA e PLA-PEG também foram capazes de reduzir significativamente a produção de NO. Ao contrário do que foi observado para as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG, as nanocápsulas de PLA-QUI provocaram um aumento significativo na produção de NO pelas células estimuladas com LPS e IFN-γ. Essas nanocápsulas na presença do soro de BALB/c também induziram aumento na produção de NO.

Existem poucos estudos demonstrando o efeito de nanocápsulas sobre a produção de NO. Sabe-se que as nanocápsulas de PLA apresentam carga superficial negativa e o efeito encontrado sobre a produção de NO pode estar relacionado com essa característica. Aramaki *et al.,* (1996) observaram que lipossomas com carga superficial negativa promoveram um efeito inibitório significativo sobre a produção *in vitro* de NO por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e IFN-γ.

Teixeira *et al.,* (2005) observaram que nanocápsulas derivadas do ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) promoveram redução significativa da produção de NO por macrófagos J774.A1. Além disso, eles demonstraram que formulações de nanocápsulas sem o excipiente lecitina não promoviam redução dos níveis de NO. Estes resultados sugerem, portanto, que a presença da lecitina na formulação de nanocápsulas de PLGA pode ter sido a principal responsável por sua atividade inibidora.

No presente trabalho, as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG foram preparadas utilizando-se lecitina (Epikuron) em sua formulação. No entanto, as nanocápsulas de PLA-QUI não foram preparadas com esse excipiente. Tal fato pode explicar os diferentes efeitos causados por essas nanocápsulas sobre a produção de NO. Enquanto as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG demonstraram um efeito inibitório assim como foi observado por Teixeira *et al.,* (2005), as nanocápsulas de PLA-QUI apresentaram um efeito estimulador sobre a produção de NO pelas células J774.A1 estimuladas.

Além disso, as nanocápsulas de PLA-QUI apresentam carga superficial positiva e os resultados obtidos se assemelham aos achados de Banerjee *et al.,* (2011) que demonstraram que lipossomas carregados positivamente induziram o aumento da produção de NO em cultura de esplenócitos obtidos de camundongos BALB/c.

Outra explicação possível para o efeito ativador das nanocápsulas de PLA-QUI seria a presença da quitosana que pode se ligar a vários receptores para polissacarídeos nos macrófagos, o que desencadearia a ativação da via de produção do óxido nítrico (Okasaki *et al.,* 1996; Rementería

et al., 1997, Kim, 1998). Vale também mencionar que o resultado encontrado para as nanocápsulas de PLA-QUI, em relação à produção de NO, se assemelha ao observado para outros polissacarídeos, como a α-D-glucana que apresentou a capacidade de estimular a produção de NO na presença de LPS e IFN-γ (Stuelp-Campelo *et al.*, 2002).

Dessa forma, acredita-se que os efeitos promovidos pelas diferentes nanocápsulas possam estar diretamente relacionados com a carga superficial e com a composição de seus excipientes. No entanto, mais estudos são necessários para se avaliar melhor o mecanismo inibitório ou estimulador dessas nanopartículas sobre a produção de NO.

Com relação à produção de citocinas, as nanocápsulas de PLA, na ausência e na presença de soro de BALB/c, promoveram aumento significativo da produção de IL-10 pelas células J774.A1 estimuladas. De maneira interessante, observou-se que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG, tanto na ausência como na presença de soro de BALB/c, reduziram significativamente a produção de TNF-α pelas células estimuladas com LPS e IFN-γ.

Sabe-se que o fator de necrose tumoral (TNF-α) é uma citocina pró-inflamatória que atua no recrutamento de leucócitos e na estimulação de fagócitos mononucleares para produção de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio (Wilhelm *et al.*, 2001). No entanto, a citocina IL-10 é considerada uma citocina imunossupressora e por isso apresenta importante propriedade anti-inflamatória. Essa citocina tem a capacidade de prevenir uma resposta imune excessiva através da inibição da apresentação de antígenos, da produção de NO e de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN-γ e TNF-α (Prakash *et al.*, 2006). Dessa forma, sugere-se que o efeito inibitório na produção de NO e TNF-α promovido pelas nanocápsulas de PLA e PLA-PEG possa ser atribuído ao aumento da produção de IL-10.

De acordo com a análise estatística observou-se que as nanocápsulas de PLA-QUI, na presença de soro de BALB/c, apresentaram efeito inibidor sobre a produção de IL-10 pelas células estimuladas. Além disso, as nanopartículas de PLA-QUI promoveram aumento significativo na produção de TNF-α. Esse resultado se assemelha ao observado por Tan *et al.*, (1999), que demonstraram que lipossomos catiônicos induziram a secreção de TNF-α por leucócitos humanos.

Conforme mencionado anteriormente, o TNF-α promove a ativação de fagócitos mononucleares para a produção de substâncias pró-inflamatórias, logo o aumento da produção de NO induzido pelas nanocápsulas de PLA-QUI pode estar diretamente ligado ao aumento de TNF-α

e à diminuição de IL-10. Dessa forma, as nanocápsulas de PLA-QUI parecem ter a capacidade de direcionar a resposta do sistema imune no sentido de induzir uma atividade inflamatória.

Os diferentes efeitos causados pelas nanocápsulas, na presença ou na ausência de soro de BALB/c, sobre a viabilidade celular e sobre a produção de NO e citocinas (IL-10 e TNF-α) podem estar relacionados com a forma ou quantidade de internalização das nanocápsulas pelas células. Assim, com objetivo de avaliar a internalização dessas nanocápsulas pelas células J774-A1, foi realizada uma análise por microscopia confocal.

A microscopia confocal demonstrou que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG foram internalizadas pelas células J774.A1. Na presença de soro de BALB/c, foi possível observar fluorescência em alguns vacúolos, demonstrando assim que pode ter ocorrido internalização das nanocápsulas por uma via diferenciada. Acredita-se que a concentração de nanocápsulas de PLA-QUI utilizada no experimento foi muito baixa, não sendo, portanto, detectada pelo microscópio confocal. A utilização de concentrações maiores se tornou inviável visto que essas foram tóxicas paras as células.

Através da análise quantitativa realizada pela CLAE, observou-se que após 4 horas de incubação, as nanocápsulas de PLA sofreram maior internalização pelas células J774.A1 do que as nanocápsulas de PLA-PEG e PLA-QUI, tanto na ausência como na presença de soro de BALB/c. Esse dados se correlacionam com achados da literatura que demonstram que nanocápsulas de PLA são mais facilmente reconhecidas por células do sistema fagocítico mononuclear do que nanocápsulas de PLA-PEG (Owens *et al.*, 2006, Mosqueira *et al.*, 1999). Além disso, foi possível observar que a presença do soro de camundongo não interferiu na internalização das nanocápsulas pelas células.

Visando avaliar se as nanocápsulas promoveriam alteração na resposta imune de macrófagos em relação a um determinado estímulo, foi realizado um experimento de pré-tratamento das células J774.A1 com diferentes concentrações de nanocápsulas. Observou-se que os resultados foram muito parecidos ao obtidos nos experimentos de tratamento. As nanocápsulas de PLA e PLA-PEG promoveram redução da produção de NO e TNF-α, com consequente aumento da produção de IL-10. Sendo assim, acredita-se que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG atuam sobre os macrófagos J774.A1 de forma a promover a ativação da resposta imune no sentido anti-inflamátório. Porém, as nanocápsulas de PLA-QUI promoveram diminuição da liberação de IL-10 pelas células estimuladas e induziram o aumento da produção de TNF-α e NO. Assim, essas nanopartículas parecem ativar uma ação pró-inflamatória pelos macrófagos J774. A1.

Conforme observado nos primeiros experimentos, as nanocápsulas são capazes de influenciar a resposta imune de macrófagos J774.A1. Tendo em vista esses resultados, objetivou-se investigar o efeito dessas nanocápsulas sobre macrófagos infectados com *L. infantum*. Foi demonstrado que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG, na presença de estímulo e de soro de BALB/c, promoveram o aumento da porcentagem de macrófagos infectados. Além disso, as nanocápsulas de PLA provocaram aumento do número de amastigotas por macrófagos. No entanto, nenhum efeito foi observado para as nanocápsulas de PLA-QUI sobre os macrófagos infectados.

Com relação ao efeito dessas nanocápsulas em modular a resposta imune de macrófagos J774.A1 infectados, foi avaliado a produção de NO e citocinas (IL-10 e TNF-α).

As nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI não apresentaram efeito sobre a produção de NO pelos macrófagos J774.A1 infectados com *L. infantum* e não estimulados. Sabe-se que o óxido nítrico é muito importante na destruição das formas amastigotas da *Leishmania* (Sousa-Franco *et al.*, 2006, Holzmuller *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que inibidores da produção de óxido nítrico levam ao aumento da sobrevivência de amastigotas e de sua replicação dentro de macrófagos de camundongos (Gantt *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2001).

Levando em consideração os resultados da produção de citocinas, observou-se que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG, na presença de estímulo e de soro de BALB/c, induziram aumento significativo da produção de IL-10. Essa citocina é capaz de inibir a morte da *Leishmania* mediada por NO e por outros mediadores (Vouldoukis *et. al.*, 1997, Kane & Mosser, 2001) e favorecer o crescimento do parasito no interior dos fagolisossomos (Iniesta *et al.*, 2001; Iniesta *et. al.*, 2002; Iniesta *et al.*, 2005). Dessa forma, acredita-se que o aumento de IL-10 promovido pelas nanocápsulas de PLA e PLA-PEG esteja diretamente relacionado ao aumento da porcentagem de macrófagos infectados e ao aumento do número de amastigotas por macrófagos. Sabe-se que o macrófago pode controlar e eliminar o parasito através de inúmeros mecanismos que envolvem a ativação de uma resposta inflamatória com consequente liberação de citocinas e intermediários reativos de oxigênio e NO (Gorak *et. al.*, 1998, Kane & Mosser, 2000). Conforme demonstrado anteriormente, as nanocápsulas de PLA, PLA-PEG atuam sobre os macrófagos J774.A1 de forma a promover a ativação da resposta imune no sentido anti-inflamatório, intensificando assim a infecção causada pela *L. infantum*.

Apesar de não ter sido completamente esclarecido o mecanismo pelo qual as nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI exercem seus efeitos, os resultados em conjunto demonstram que

essas nanocápsulas atuam sobre o sistema imune, elicitando e desencadeando uma resposta imunológica pelos macrófagos J774.A1.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Existem poucos estudos correlacionando o efeito das nanocápsulas sobre o sistema imune, logo os resultados obtidos são bastante promissores, uma vez que podem ampliar e até mesmo direcionar o uso das nanocápsulas na vetorização de fármacos.

Este é o primeiro relato demonstrando que nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI, por si só, apresentam uma atividade moduladora significativa sobre a produção de NO, TNF-α e IL-10. Na presença do soro fresco de camundongos BALB/c, essa atividade pôde ser observada em concentrações mais baixas dessas nanocápsulas. Além disso, os experimentos de pré-tratamento demonstraram que as nanocápsulas de PLA, PLA-PEG e PLA-QUI apresentam a capacidade de promover alteração na resposta imune de macrófagos J774.A1 a um determinado estímulo.

Assim, através de seu efeito imunomodulador, essas nanocápsulas poderão ser utilizadas para atuar em sinergismo com determinadas drogas, visando dessa forma, aumentar a eficiência de tratamento para muitas doenças.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Adams, D.O. Macrophages. *Methods Enzymol.*, 58: 494-506, 1979.

Aderem A., Underhill D. M, Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Ann Rev Immunol*, 17: 593-623, 1999.

Amura CR, Kamei T, Ito N, Soares MJ, Morrison DC: Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. *J Immunol*, 161:2552-2560, 1998.

Angelova, N., Hunkeler, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol*, 17: 409-421, 1999.

Aramaki Y., Nitta F., Matsuno R., Morimura Y, Tsuchiya S., Inhibitory Effects of negatively charged liposomes on Nitric oxide production from macrophages Stimulated by LPS. *Biochem Biophys Res Commun.* 220: 1–6, 1996.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 14: 523-532, 1996.

Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17: 93-102, 1996.

Banker, S. G.; Rhodes, C. T. Modern Pharmaceutics. New York: Marcel Dekker, 1996.

Banerjee A, Roychoudhury J, Ali N. Stearylamine-bearing cationic liposomes kill leishmania parasites through surface exposed negatively charged phosphatidylserine. *J Antimicrob Chemother*, 61: 103-10, 2008a.

Banerjee A, De M, Ali N. Complete cure of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin b in stearylamine-bearing cationic liposomes involves down-regulation of IL-10 and favorable T cell responses. *J Immunol.* 181: 1386-98, 2008b.

Banerjee A, De M, Ali N. Combination therapy with paromomycin-associated stearylamine-bearing liposomes cures experimental visceral leishmaniasis through th1-biased immunomodulation. *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 1661-1670, 2011.

Barratt, G. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm Sci Technolo Today*, 3: 163-171, 2000.

Berscht P. C., Nies, B., Liebendorfer A. and Kreuter J. Incorporation of basic fibroblast growth factor into methylpyrrolidinone chitosan fleeces and determination of the in vitro release characteristics. *Biomaterials* 15: 583–600, 1994.

Billiar, T.R.; Hofman, R.A.; Curran, R.D.; Langehr, J.M.; Simmons, R.L. A role of inducible nitric oxide biosynthesis in liver in inlflammation and in the allogenic immune response. *J Lab Clin Med,* St. Louis, 120: 192-197, 1992.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-γ. *Annu Rev Immunol,* 15: 749-95, 1997.

Burk, D.R., Senechal-Willis, P., Lopez, L.C., Hogue, B.G., D, S.M. Supression of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages by aqueous extract of *Clinopodium vulgare L. (Lamiaceae). J Ethnopharmacol,* 126: 397-405, 2009.

Carreno-Gomez B, Duncan R. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *Int J Pharm;* 148: 231-240, 1997.

Carswell, E.A.; Old, L.J.; Kassel, R.L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. An endotoxin-indiced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* Washington, 72: 3666-3670, 1975.

Cavaillon, J.M. Cytokines and macrophages. *Biomed. Pharmacother.,* Paris, 48: 445-453, 1994.

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., et al., Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 873–82, 2007.

Chen, K.; Huang, J.; Gong, W.; Iribarren, P.; Dunlop, N.M.; Wang, J.M. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol,* 7: 1271-1285, 2007.

Chi, D.S.; Qui, M.; Krishnaswamy, G.; LI, C.; Stone, W.; Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. Nitric Oxide: *Biol. Chem.,* 8: 127-132, 2003.

Conti, P.; Kempuraj, D.; Kandere, K.; Di Gioacchino, M.; Barbacane, R.C.; Castellani, M.L.; Felaco, M.; Boucher, W.; Letourneau, R.; Theoharides, T.C. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett,* 86: 123-129, 2003.

Cotran, R.S.; Kumar, V.; Robbins, S.L. Robbins: Pathologic basis of disease. 5 ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 11-13, 1994.

Das M, Mukherjee SB, Shaha C. Hidrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci.* 114: 2461-2469, 2001.

De Wall Malefyt, R.; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C.G.; De Vries, J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med,* 174: 1209-1220. 1991.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318, 2004

Dey, T., K. Anam, F. Afrin, N. Ali. Antileishmanial activities of stearylamine-bearing liposomes. Antimicrob. *Agents Chemother.* 44: 1739-1742, 2000.

Dobrovolskaia MA, McNeil SE: Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol* 2: 469–478, 2007.

Durner , J.; Gow, A. J.; Stamler, J. S.; Glazebrook, J.; Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 206- 207, 1999.

Durand, R., Paul, M., Rivollet, D., Fessi, H., Houin, R, Astier, A. & Deniau, M,. Activity of pentamidina-loaded methacylate nanoparticles against *Leishmania infantum* in a murine model. *J Parasitol*, 27: 1361-1367, 1997.

Essa S, Rabanel JM, Hildgen P. Characterization of rhodamine loaded PEG-g PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene gycol) grafting density. *Int J Pharm.* 11: 178-187, 2011.

Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P. ; Ammoury, N. ; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International J Pharm*, 55: R1-R4, 1989.

Fiorentino, D.F.; Zlotnik, A.; Mosmann, T.R.; Howard, M.; O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 147: 3815-3822. 1991.

Flora Filho, R.; Zilberstein, B. Óxido Nítrico: O Simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 46: 265-271, 2000.

Forman, H. J.; Torres, M.; Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.*, 22: 189-216, 2001.

Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi. *J. Immunol.* 167: 893-9011, 2001.

Goosen, M. E. A – "Applications of chitin and chitosan", Technomic Publishing Company, Lancaster.,1996.

Gorak P.M., Engwerda C.R. & Kaye P.M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. *Eur. J. Immunol.* 28: 687-695, 1998.

Grenn, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N nitrates] in biological fluids. *Analytical Biochem.* 126: 131-138, 1982.

Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Trubetskoy, V.; Torchilin,V.; Langer, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 163: 1600-1603, 1994.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. Free redicals reactive species and toxicology. In: Halliwel, B. & Gutteridge, J.M.C. (eds.), *Free Readic. Biol. Med.*, New York, 544-616, 1999.

Hamidi, M., Azadi, A., Rafiel, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 60: 1638-1649, 2008.

Hans, M. L.; Lowman. A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. Current Opinion in Solid State and Materials *Science,* 1: 000-000, 2002.

Heurtault, B.; Legrand, P.; Mosqueira, M.; Devissaguet, J. P.; Barratt, G. The antileishmanial properties of surface-modified, primaquine-loaded NC tested against intramacrophagic Leishmania donovani amastigotas in vitro. *Ann Trop Med Parasitol,* 95: 529-533, 2001.

Herwaldt B L. Leishmaniasis. *Lancet.* 354: 1191-99, 1999.

Holzmuller P, Hide M, Sereno D, Lemesre J. Leishmania infantum amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: impacto on in vitro parasite develpmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infect Genet Evol.* 6: 187-97, 2006.

Howard, M.; O'Garra, A.; Ishida, H.; Malefyt, R.W.; De Vries, J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol,* 12: 239-247, 1992.

Hussain S., Vanoirbeek J.A., Hoet P.H., Interaction of nanomaterials with the immune system. WIREs *Nanomed Nanobiotechnol ,* 4: 169–183, 2012.

Iniesta V., Gómez-nieto L.C. & Corraliza I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-l-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages. *J Exp Med.* 193: 777-784, 2001.

Iniesta V., Gómez-nieto L.C., Molano I., Mohedano A., Carcelén J., Mirón C., Alonso C. & Corraliza I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites. *Parasite Immunol.* 24: 113-118, 2002.

Iniesta V., Carcelén J., Molano I., Peixoto P.M., Redondo E., Parra P., Mangas M., Monroy I., Campo M.L., Nieto C.G. & Corraliza I. Arginase I induction during Leishmania major infection mediates the development of disease. *Infect Immun.* 73: 6085-6090, 2005.

International Standard – ISO 10993-5: 2009 (E)

Jumaa M, Müller BW. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. *Int J Pharm;* 183: 175-184, 1999.

Kane M.M. & Mosser, D.M. *Leishmania* parasites and their plays to disrupt macrophageactivation. Curr. Opin. Hematol., 7: 26-31, 2000.

Kane M.M. & Mosser D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 166: 1141-1147, 2001.

Katsikis, P.D.; Chu, C.Q., Brennan, F.M.; Feldmann, M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.,* 179: 1571-1527, 1994.

Kim, S.W. Nitric oxide production ability and its formation mechanisms in macrophages TIB 71 cells line by polysaccharide extracted from Gonoderma lucidum. *Journal of the Korean Society Food Science Nutrition,* Seoul, 27: 333-337, 1998.

Lainson L, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In Biology of the Kinetoplastida. London and New York: *Academic Press.* 2, 1979.

Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J-P. Polymeric NC as drug delivery systems: a review. S.t.p. *Pharma sci.,* Paris 9:.411-418, 1999.

Lemarchand, C.; Gref, R.; Couvreur P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur. Jour. of Pharmac. And Biopharmac*., 58: 327-341, 2004

Li, Y. P.; Pei, Y. Y.; Zhou, Z. H.; Zhang, X. Y. ; GU, Z. H.; Ding, J. ; Zhou, J. J.; Gao, X. J.; Zhu, J.H. Stelth polycyanocrylate nanoparticles as tumor necrosis factor-α carriers: pharmacokinetics and anti-tumor effects. *Biol Pharm Bull,* 24: 662-665, 2001.

Lin, W.; Wu, R.T.; Wu, T.; Khor, T-O.; Wang, H.; Kong, A-N. Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochem Pharmacol,* 76: 967-973, 2008.

Lukes, J., Mauricio, I.L., Schönian, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W., Jirku, M., Chocholová, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F.J., Miles, M.A., Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 9375–9380, 2007.

MacMicking, J.; Xie, Q.W.; Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann. Rev.Immunol,* 15: 323-350, 1997.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Trends and Challenges/Leishmaniose Visceral no Brasil: Evolução e desafios. *Cad Saude Publ;* 24: 2941-7. 2008.

Manandhar, K.D. et al. Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. *J Antimicrob Chemother,* 62: 376-380, 2008.

Mannel, D.N.; Moore, R.N. Mergenhagen, S.E. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor necrosis factor). *Infect. Immunol.,* 30: 523-526, 1980.

Marzochi, MCA. ET AL. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: Ecoepidemiological Aspects and Control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,* 42: 570-580, 2009.

Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188-189, 2000.

Mayer, B.; Hemmens, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in Biochem. Sci.*, Kidlington, 22: 477-481, 1997.

McInnes, I.B.; Illei, G.G.; Danning, C.L.; Yarboro, C.H., Crane, M.; Kuroiwa, T.; Schlimgen, R.; Lee, E.; Foster, B.; Flemming, D.; Prussin, C.; Fleisher, T.A.; Boumpas, D.T. IL-10 improves skin disease and modulates endothelial activation and leukocyte effector function in patients with psoriatic arthritis. *J Immunol., 167*: 4075-4082, 2001.

McNeil, S. E. Nanotechnology for the biologist. *J. Leukoc. Biol.* 78: 585–594, 2005.

Melo, C. P.; Pimenta, M. Nanociências e Nanotecnologia. Parcerias Estratégicas/ CGEE 18: 09-21, 2004.

Meng F, Lowell CA: Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med,* 185: 1661- 1670, 1997.

Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral Grave. Normas e Condutas. 1A Edição. Brasília – DF, 2006.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1a edição. Brasília-DF, 2006.

Morikawa, K. and Yanagida, J. Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method. *J. Biochem*. (Tokyo) 89: 693-6, 1981.

Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55–63. 1983.

Mosmann, T.R.; Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol,* 7: 145-173, 1989.

Mosqueira VC, Legrand P, Gref R, Heurtault B, Appel M, Barratt G., Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D,L-lactide) NC bearing poly(ethylene glycol). *J Drug Target.* 7: 65-78. 1999.

Mosqueira, V. C. F. NC à temps de circulation prolongé: caractérisation, évaluation biologique et mise au point d'un anipalidéen, l'halofantrine. 268f. Tese (Doutorado) – Faculte de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Université Paris XI, Paris, 2000.

Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Morgat, J. L.; Vert, M.; Mysiakine, E.; Gref, R.; Devissaguet, J. P.; Barrat, G. Biodistribuition of long-circulating PEG-grafted NC in mice: Effects of PEG chain length and density. *Pharm Res,* 18: 1411-1419, 2001.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577, 2005.

Ohya, Y.; Cai, R.; Nishizawa, H.; Hara, K.; Ouchi, T. S.T.P. *Pharma Sciences*, 10: 77-82, 2000.

Okasaki, M.; Chiba, N.; Adachi, Y.; Ohno, N.; Yodamae, T. Signal transduction pathway on b-glucans triggered hydrogen peroxide production by murine macrophages in vitro. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, 19: 18-23, 1996

Oliveira, Líliam Teixeira (Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Ouro Preto, 128P. 2009.

Oliveira, L.T., Garcia, G.M., Kano, E.K., Tedesco, A.C., Mosqueira, V.C.F. HPLC-FLD methods to quantify chloroaluminum phthalocyanine in nanoparticles, plasma and tissue: application in pharmacokinetic and biodistribution studies. *J Pharm Biomed Anal.* 56: 70-77, 2011.

Owens, III D. E.; Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. Journal of Pharm.*, 307: 93-102, 2006.

Peracchia, M. T.; Fattal, E.; Desmaele, D.; Bernard, M.; Noel, J. P.; Gomis, J. M.; Appel, M.; d'angelo, J.; Couvreur, P. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release.*60: 121-128, 1999.

Pinheiro Jr. N F, Hermida M D R, Macedo M P, Mengel J, Bafica A, dos-Santos W L C. Leishmania Infection impairs beta 1-Integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 74: 3912–3921, 2006.

Pison, U.; Welte, T.; Giersig, M.; Groneberg, D. A. Nanomedicine for respiratory diseases. *Eur J Pharmacol.* 533: 341–350, 2006.

Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, Pied S. Clusters of cytokines determine malaria severity in plasmodium falciparum–infected 107 patients from endemic Areas of Central India. *J Infect Dis.* 194: 198-207, 2006.

Prego C, Paolicelli P, Díaz B, Vicente S, Sánchez A, González-Fernández A, Alonso MJ. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine.* 2010 Mar 19;28(14):2607-14.

Qin CQ, Du YM, Xiao L, Li Z, Gao XH. Enzymic reparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int J Biol Macromol;* 31: 111-117, 2002.

Qi, L. F., Xu, Z. R., Jiang X, Hu CH, Zou XF. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohyd Res;* 339: 2693-2700, 2004.

Qi, L. F., Xu, Z. R., Li, Y., Jiang, X., & Han, X. Y. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J Gastroenterol.* 11: 5136–5141, 2005

Qi, L., Xu, Z. in vivo Antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorg Med Chem Lett*, 16: 4243–4245, 2006

Quitanar-Guerrero, D.; Allemann, E.; Fessi, H.; Dolker, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm.,* 24: 1113-1128, 1998.

Rementería, A.; Abaitua, F.; Garcia-Tobalina, R.; Hernando, F.;Pontón, J.; Sevilla, M.J. Resistance to candidiasis and macrophages activity inchitin-treated mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.,* Amsterdam, 19: 223-230, 1997.

Roberts, G. A. F. - "Chitin Chemistry", The Macmillan Press, London.,1992.

Ross R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. *Brit. Med. J.* 2: 1261-1401, 1903

Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., Endocytosis of nanomedicines, *J. Control. Release*, 145: 182-195, 2010.

Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freita, L. L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26: 726-737, 2003.

Scheu, M.; Veekind, V.; Verbandt, Y.; Molina Galan, E.; Absalom, R.; Forster, W. Mapping nanotechnology patents: The EPO approach. World Patent Information, 28: 204–211, 2006.

Sieuwerts, A.M.; Klijn, J.G.M.; Peters, H.A.; Foekens, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50- values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.,* 33: 813-823, 1995.

Silva, A. R. A.; Simioni, A. R.; Tedesco, A. C. Photophysical and Complexation Studies of ChloroAluminum Phthalocyanine with Beta-Cyclodextrin and Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. *J. Nanosci. Nanotech.* 11: 4046-4055, 2011.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Leishmania) amazonensis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100: 525-34, 2005.

Song, J.Y.; Han, S.K.; Son, E.H.; Pyo, S.N.; Yun, Y.S.; Yi, S.Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *Int Immunopharmacol.,* 2: 857-865, 2002.

Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE: Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 70: 1-20, 2001.

Souba, W.W., Cytokine control of nutritional and metabolism in critical illness. In: Current Problems in Surgery. Mosby-Year Book, Inc, St Louis, Mo. XXXI: 579-643, 1994.

Sousa-Franco J, Araújo-Mendes E, Silva-Jardim I, Santos JL, Faria DR, Dutra WO. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills Leishmania guyanensis amastigotes through

apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect.* 8: 390-400, 2006.

Stovroff, M.C.; Fraker, D.L.; Norton, J.A. Cachectin activity in the serum of cachectic, tumor-bearing rats. *Arch. Surg.,* Chicago, 124: 94-99, 1989.

Stuehr, D.J. & Marletta, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* Washington, 82: 7738-7742, 1985.

Stuelp-Campelo, P.M.; Oliveira, M.B.M.; Leão, A.A.C.; Carbonero, E.R.; Gorin, P.A.J.; Iacomini, M. Effect of a soluble a-D-glucan from the lichenized fungus Ramalina celastri on macrophage activity. *Int. Immunopharmacol.,* 2: 691-698, 2002.

Tan, Y., Li, S., Pitt, B. R. & Huang, L. The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. Hum. *Gene Ther.* 10: 2153–2161, 1999.

Teixeira, M.; Cerqueira, F.; Barbosa, C.; Nascimetno, M.S.J.; Pinto, M.M.M. "Improvement of the inhibitory effect of xanthones on NO production by encapsulation in PLGA NC", *J Drug Target*., 13: 129-135, 2005.

Van der Veen, R.C.; Dietlin, T.A.; Gray, J.D.; Gilmore, W. Macrophagederived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T Helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. *Cell. Immunol.,* Orlando, 199: 43-49, 2000.

Vouldoukis I., Bécherel P.A., Riveros-Moreno V., Arock M., Da Silva O., Debré P., Mazier D. & Mossalayi M.D. (1997) Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of Leishmania infantum and Leishmania major by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol.* 27, 860-865.

Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C, Körner H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol.* 166: 4012-9, 2001.

WHO - World Health Organization. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em 21 jul. 2011.

Zheng LY, Zhu JF. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohyd Polym; 54: 527-530, 2003.

Zhuang, J.C.; Wogan, G.N. Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* Washington, 94: 11875-11880, 1997.