

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Ana Paula De Battisti Ribeiro

**Avaliação da atividade leishmanicida de soluções de Pluronic[®]
F-127 contendo anfotericina B para o tratamento da
leishmaniose visceral murina.**

Ouro Preto

2014

ANA PAULA DE BATTISTI RIBEIRO

**Avaliação da atividade leishmanicida de soluções de Pluronic[®]
F-127 contendo anfotericina B para o tratamento da
leishmaniose visceral murina.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Mário Barichello

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Aparecida Rezende

Ouro Preto - Minas Gerais - Brasil

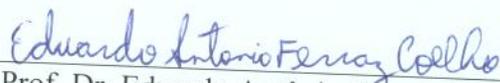
Agosto/2014

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

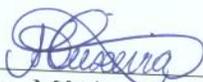
ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 92ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA ESCOLA DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

1 Aos dezenove dias do mês de setembro de dois mil e quatorze, sexta-feira, realizou-se,
2 a partir das treze horas e trinta minutos, no Auditório da Escola de Farmácia, a sessão
3 de defesa de dissertação da candidata ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas,
4 **Ana Paula De Battisti Ribeiro** intitulada: “Avaliação da atividade leishmanicida de
5 soluções de Pluronic® F-127 contendo anfotericina B para o tratamento da
6 leishmaniose visceral murina”. A Banca Examinadora foi constituída pelo Prof.
7 Eduardo Antônio Ferraz Coelho (UFMG), Profa. Mônica Cristina Teixeira (UFOP) e
8 pelo orientador Prof. José Mário Barichello (UFOP). De acordo com o regulamento do
9 Curso, o orientador, Prof. José Mário Barichello, presidente da banca, abriu a sessão,
10 passando a palavra à candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi
11 realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva
12 defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença
13 da candidata, tendo deliberado pela sua APROVAÇÃO.
14 Nada mais havendo para constar, lavrou-se a presente ata por mim, Mirela Pena
15 Fagundes, secretária do CiPharma, e fez-se a leitura da presente ata que segue assinada
16 pelos membros da Banca Examinadora e pela Coordenadora do Curso.
17
18

19 Ouro Preto, 19 de setembro de 2014.

20
21 

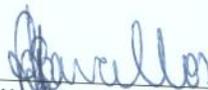
22 Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho
23 UFMG
24

25
26 

27 Profa. Dra. Mônica Cristina Teixeira
28 UFOP
29

30
31 

32 Prof. Dr. José Mário Barichello
33 UFOP
34

35
36 

37 Profa. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos
38 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
39 Ciências Farmacêuticas - CiPharma

D286a De Battisti Ribeiro , Ana Paula .
Avaliação da atividade leishmanicida de soluções de
Pluronic F-127 contendo anfotericina B para o tratamento da
leishmaniose visceral murina. [manuscrito] / Ana Paula
De Battisti Ribeiro . - 2014.
76f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: José Mário Barichello.
Coorientadora: Simone Aparecida Rezende.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro
Preto. Escola de Farmácia . Cipharma .
Área de Concentração Fármacos e Medicamentos .

1. Leishmaniose visceral. 2. Anfotericina B. I.
Barichello, José Mário . II. Rezende, Simone Aparecida.
III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso

Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) – NUPEB – UFOP.

Prof. Dr. Roney Luiz de Carvalho Nicolato

Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) – EFAR – UFOP.

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que sofrem de leishmaniose ou de qualquer outra doença negligenciada ao redor do mundo. Prosseguimos em busca de dias melhores.

*“Todos os dias, quando o sol desponta,
o cervo acorda.
Ele sabe que precisa correr mais rápido
que o mais rápido dos leões para
sobreviver.
Todas as manhãs, o leão acorda.
Ele sabe que terá que correr mais
rápido que o mais lento dos cervos,
senão morrerá de fome.
Não importa se você é cervo ou leão.
Quando o sol nascer, comece a correr.”*

(Provérbio africano)

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão a Deus, por me fazer otimista e cheia de fé, por plantar em mim a inquietação que me impulsiona todos os dias e por fazer com que eu tenha na vida muito mais a agradecer do que a pedir.

Aos meus pais Janice e Rigoberto pela criação que recebi e pela confiança nas minhas decisões, assim como na minha capacidade de tomá-las.

Aos meus irmãos Rosane e Marconi por me ensinarem o que é o amor incondicional.

À minha querida república Maria Malagueta por me acolher de volta no início atribulado e confuso deste mestrado.

Ao Edgard por: formatar esta dissertação; desenhar as figuras; arrumar as fotografias; impedir que eu enlouquecesse e/ou morresse de fome nos dias de experimentos intermináveis; e por ser em quem meu coração pode enfim descansar.

Ao Prof. José Mário Barichello pela orientação e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Prof^a. Simone Rezende pelos ensinamentos, bons conselhos e me ajudar a resolver “questões diplomáticas”.

Ao CiPharma por permitir que eu aprofundasse meus conhecimentos no mundo fascinante e infinito das Ciências Farmacêuticas.

À Capes pelo subsídio.

Como ninguém chega a lugar nenhum sozinho, devo agradecer aqui a muitas pessoas que contribuíram de alguma forma para que este trabalho acontecesse. Agradeço a: Thaís, Lucas, Eliete, Simone, Ricardo, Vanessa, Líliam e Giani pelos bons momentos e companhia na bancada do LDG Nano. Renata, Flávia, Fernanda, Marina e Walyson pelos treinamentos e auxílio nos experimentos sempre com disposição e boa vontade no LIP e LPC. Aos professores Luís Carlos e Sandra por permitirem que eu utilizasse os equipamentos do LIP inúmeras vezes. Ao Dr. Roney e a todos do LAPAC pela prontidão em me ajudar todas as vezes que precisei, especialmente nas

análises bioquímicas deste trabalho e à Bioclin – Quibasa por ceder os reagentes necessários para tal. Aos colegas de mestrado Paty, Carol Lício, Carol Moreira e Rory por todo incentivo, colaborações, amizade e por me salvarem tantas vezes, seja com o uso do Prisma ou com os equipamentos dos laboratórios.

Ao CCA por todo o cuidado com os animais, essencial para o andamento da pesquisa *in vivo*.

À Mirela, Léo, Patrícia, Ramon e John, sempre tão gentis e prontos para ajudar.

À Suellen por ser tão especial e querida e me aturar durante o tempo em que moramos juntas. A todos os amigos que torcem por mim e a todos que me incluem em suas orações (tem funcionado!).

À família Paiva pelo acolhimento e incentivo.

À Labtest por me contratar mesmo sabendo que eu tinha este mestrado para terminar e por todas as concessões para que eu pudesse fazê-lo.

À belíssima Ouro Preto por ser para onde eu sempre posso (e quero) voltar. “Minha ilha perdida é aí, o meu pôr-do-sol...”

RESUMO

A leishmaniose é uma classe de doenças crônicas debilitantes, endêmica em áreas tropicais e subtropicais. Os medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento desta doença apresentam alta toxicidade e complicados regimes posológicos. O uso de polímeros como nanocarreadores para a administração de fármacos traz novas possibilidades à terapêutica e tem como objetivo reduzir os efeitos colaterais, diminuir o número de doses e prolongar os intervalos entre as administrações. Neste trabalho, foram desenvolvidas e avaliadas formulações de Pluronic[®] F-127 (F127) para veicular anfotericina B (AnB) no tratamento da leishmaniose visceral murina. Resultados demonstraram que as formulações de F127 são formadas por micelas/partículas de tamanho entre 100-150 nm e que o sistema micelar que as constitui não apenas estabilizou a AnB pelo período de 360 dias, como também liberou o fármaco da formulação no estado gel de forma controlada. Camundongos BALB/c foram inoculados com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* por via endovenosa e tratados por via subcutânea com as formulações de F127 contendo 150 e 300 µg/mL de AnB, após seis semanas da infecção. Observou-se redução significativa na carga parasitária do fígado e baço dos animais tratados com F127 + AnB 150µg/mL, porém o mesmo não ocorreu na medula óssea. No entanto, a formulação contendo 300µg/mL de AnB não exerceu nenhum efeito significativo sobre a carga parasitária de nenhum desses órgãos, assim como a AnB livre. As análises bioquímicas mostraram que os grupos tratados com as formulações de F127 contendo AnB não apresentaram efeito nefrotóxico ou hepatotóxico. Os resultados deste trabalho mostram que a solução de F127 a 16% + AnB 150µg/mL administradas por via subcutânea podem representar uma alternativa terapêutica eficaz na redução da carga parasitária em diferentes órgãos alvo da leishmaniose visceral. Com a possibilidade do uso de vias de administração menos invasivas e redução dos efeitos colaterais, o presente trabalho lança uma luz sobre novas alternativas de tratamento da leishmaniose visceral.

Prof. Dr. José Mário Barichello

Ana Paula De Battisti Ribeiro

ABSTRACT

Leishmaniasis is a chronic debilitating class of diseases, and it is endemic in tropical and subtropical areas. The medication available for the treatment of this disease present high toxicity and very complex dosing regimens. The use of polymers as nanocarriers for drug delivery brings new possibilities to therapy and aims to reduce side effects, reduce the number of doses and prolong the intervals between administrations. In this paper, were developed and evaluated formulations of Pluronic[®] F-127 (F127) to deliver amphotericin B (AmB) in the treatment of murine visceral leishmaniasis. Results showed that F127 formulations are formed by micelles / particles of size between 100-150 nm and the and that micellar system that constitute it not only stabilized AmB for the period of 360-day, but also released the drug formulation in the gel state in a controlled manner. BALB/c mice were inoculated with 1×10^7 promastigotes of *L. infantum* intravenously and treated subcutaneously with F127 formulations containing 150 and 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of AmB after six weeks of the infection. A significant reduction in parasite load of the liver and spleen of animals treated with AmB F127 + 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, however, this did not occur in the bone marrow. However, the formulation containing 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$ AmB had no significant effect on the parasite load of any of these organs, as well as free AmB. Biochemical analyzes showed that the groups treated with F127 formulations containing AmB did not present any nephrotoxicity or hepatotoxicity effects. The results of this paper shows that F127 at 16% solution + AmB at 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ administered subcutaneously can represent an effective therapeutic option in the reduction of the parasitic load on different target organs of visceral leishmaniasis. With the possibility of using less invasive routes of administration and reduction of side effects, this study sheds light on new alternatives for treatment of visceral leishmaniasis.

Prof. Dr. José Mário Barichello

Ana Paula De Battisti Ribeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sinais clínicos da leishmaniose.....	16
Figura 2: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	19
Figura 3: Estrutura química da anfotericina B.....	23
Figura 4: Perfis espectrofotométricos dos diferentes estados de agregação da anfotericina B.....	26
Figura 5: Representação esquemática da formação de poros hidrofílicos na membrana celular devido à associação entre anfotericina B e esteróis presentes na membrana.....	28
Figura 6: Copolímero em bloco Pluronic® F-127.....	31
Figura 7: Representação esquemática dos mecanismos de associação do Pluronic® F-127 em água.....	32
Figura 8: Representação esquemática do aparato usado no preparo da formulação.....	35
Figura 9: Representação esquemática do aparato utilizado no estudo de liberação de anfotericina B da formulação de F127 a 16% no estado gel.....	36
Figura 10: Curva de calibração e equação de reta do padrão de anfotericina B em tampão fosfato pH= 7,4.....	38
Figura 11: Curva de calibração e equação da reta do padrão de anfotericina B em metanol.....	39
Figura 12: Delineamento experimental referente à avaliação da atividade leishmanicida e análise bioquímica das amostras retiradas dos camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> após os diversos tratamentos.....	42
Figura 13: Diagrama referente ao experimento de quantificação de parasitos para avaliação da atividade leishmanicida das formulações de F127 + anfotericina B.....	45
Figura 14: Aspecto físico das formulações de F127 + anfotericina B.....	47

Figura 15: Perfil de liberação da anfotericina B da formulação de F127 a 16% no estado gel.....	48
Figura 16: Estabilidade da anfotericina B na formulação de F127 a 16% no estado sol e gel.....	51
Figura 17: Curva de crescimento in vitro da cepa C43 de <i>Leishmania infantum</i> em meio Grace´s 10% de Soro Fetal Bovino a 23°C.....	52
Figura 18: Carga parasitária no fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> após diferentes tratamentos.....	53
Figura 19: Fotografia representativa do fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> após diferentes tratamentos.....	55
Figura 20: Fotografia representativa do baço de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> após diferentes tratamentos.....	56
Figura 21: Peso médio do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> após diferentes tratamentos.....	57
Figura 22: Avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c sadios após diferentes tratamentos.....	58
Figura 23: Avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> após diferentes tratamentos.....	59
Figura 24: Avaliação bioquímica da função renal de camundongos BALB/c sadios após diferentes tratamentos.....	61
Figura 25: Avaliação bioquímica da função renal de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> após diferentes tratamentos.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Incidência de leishmaniose visceral notificada e estimada no Brasil e diversas regiões do mundo.....	17
Tabela 2: Solubilidade da anfotericina B.....	24
Tabela 3: Características dos diferentes estados de agregação da anfotericina B.....	26
Tabela 4: Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das micelas/partículas presentes nas formulações de F127 + anfotericina B.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina cetoglutatarato aminotransferase
AmB	Amphotericin B
AnB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato cetoglutatarato aminotransferase
CCA	Centro de Ciência Animal
DALY	<i>Disability-adjusted life years</i>
DMEM	Meio essencial mínimo Dubelcco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTN	Doença Tropical Negligenciada
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
F127	Pluronic [®] F-127
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LPG	Lipofosfoglicano glicoconjugado
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
OMS	Organização Mundial de Saúde
OE	Óxido de etileno

OP	Óxido de propileno
PCR- RFLP	<i>Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism</i>
SFB	Soro fetal bovino
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Histórico.....	14
2.1.1 Etiologia e manifestações clínicas das leishmanioses.....	14
2.1.2 Epidemiologia	16
2.1.3 Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	18
2.1.4 Modelo murino de leishmaniose	20
2.1.5 Leishmaniose e tratamento.....	21
2.2 Anfotericina B	23
2.2.1 Nanoformulações de anfotericina B.....	29
2.3 Pluronic® F-127.....	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Material.....	34
4.2 Desenvolvimento das formulações de F127 contendo anfotericina B	34

4.3	Estudo de liberação <i>in vitro</i> de anfotericina B da formulação de F127 a 16% no estado gel.	35
4.4	Estudo de estabilidade da anfotericina B no estado sol e gel da formulação de F127	36
4.5	Quantificação da anfotericina B por espectroscopia no UV	37
4.6	Análise do tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das micelas/partículas das formulações de F127 contendo anfotericina B	39
4.7	Cepa de <i>Leishmania infantum</i>	39
4.8	Manutenção da cepa C43 e curva de crescimento	40
4.9	Infecção experimental por <i>Leishmania infantum</i>	40
4.10	Tratamento	41
4.11	Avaliação da atividade leishmanicida das formulações de anfotericina B	43
4.12	Avaliação da toxicidade das formulações no tratamento de camundongos não infectados.	46
4.13	Análises bioquímicas	46
4.14	Análises estatísticas	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Desenvolvimento das formulações de F127 contendo anfotericina B. ...	47
5.2	Estudo de liberação da anfotericina B a partir da formulação de F127 a 16% no estado gel <i>in vitro</i>	48
5.3	Análise do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das micelas/partículas das formulações de F127 contendo anfotericina B	49
5.4	Estudo de estabilidade da formulação de F127 a 16% + anfotericina B nos estados sol e gel.	51
5.5	Curva de crescimento da cepa C43 de <i>Leishmania infantum</i>	52
5.6	Avaliação da atividade leishmanicida após tratamento com diferentes formulações	53

5.7	Características morfológicas do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> após diferentes tratamentos .	54
5.8	Avaliação da função hepática em camundongos BALB/c sadios e infectados com <i>Leishmania infantum</i> após diferentes tratamentos.	58
5.9	Avaliação da função renal em camundongos BALB/c sadios e infectados com <i>Leishmania infantum</i> após diferentes tratamentos.....	60
6	CONCLUSÃO.....	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença crônica e sistêmica, que apresenta duas formas clínicas: cutânea e visceral. É causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e transmitida ao homem pela picada de insetos flebotomíneos, dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. Um estudo recente mostrou que atualmente há transmissão endêmica de leishmaniose em 98 países de 5 continentes e que a contagem oficial de casos cresce a cada ano (ALVAR *et al.*, 2012).

O tratamento farmacológico disponível atualmente para a leishmaniose visceral envolve formulações de administração endovenosa, dentre elas os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B (AnB) e a pentamidina (HERWALDT, 1999; CROFT, 2001; CHAPPUIS *et al.*, 2007; WHO, 2010). Apesar de eficaz, a terapia parenteral apresenta diversos aspectos que limitam a adesão do paciente ao tratamento, como o longo tempo de internação necessário e os vários efeitos colaterais provenientes da via de administração e da dose elevada. Por isso, a pesquisa de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose é de suma importância para a saúde humana. O uso de sistema nanoestruturado para a administração de fármacos traz novas alternativas à terapêutica, além da possibilidade de reduzir os efeitos colaterais, diminuir o número de doses e prolongar os intervalos de administração (TORRADO *et al.*, 2008).

Foi neste contexto que se propôs a incorporação da AnB – um fármaco com atividade leishmanicida comprovada, porém com diversos efeitos tóxicos graves – em soluções de Pluronic[®] F-127 (F127) e a avaliação da atividade leishmanicida destas formulações *in vivo*. Com tal propósito, foi feito o ensaio de quantificação de parasitos no fígado, baço e medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. Análises bioquímicas de creatinina, ureia, aspartato cetogluturato aminotransferase (AST) e alanina cetogluturato aminotransferase (ALT) foram realizadas nos soros coletados de animais infectados e sadios tratados com diferentes formulações a fim de se avaliar a toxicidade das formulações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A descoberta dos agentes etiológicos causadores das leishmanioses ocorreu no final do século XIX, quando Cunningham, em 1885, na Índia, descreveu formas amastigotas em casos de calazar. Em 1903, William Leishman e Charles Donovan isolaram parasitos do baço de pacientes que apresentavam esplenomegalia, realizando as primeiras descrições do protozoário responsável pelo calazar indiano, denominado mais tarde de *Leishmania donovani* (RATH *et al.*, 2003). A partir de então, muito se pesquisou e se descobriu sobre o protozoário causador da leishmaniose visceral. As várias espécies de parasitos do gênero *Leishmania* são causadoras de diversas síndromes com sinais e sintomas muito distintos, com disseminação progressiva em países de todo o mundo. Mesmo após um século desde o seu isolamento, ainda não há tratamento seguro e eficaz contra os protozoários causadores da leishmaniose. Por isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incentiva a pesquisa e obtenção de novos fármacos e formulações para o tratamento de tal moléstia.

2.1.1 Etiologia e manifestações clínicas das leishmanioses

Diversas espécies de *Leishmania* podem causar leishmaniose. E a combinação de fatores intrínsecos ao parasito (espécie e cepa) com a resposta imune montada pelo hospedeiro (influenciada pela idade, estado nutricional, dentre outros fatores), resultam nas diferentes manifestações clínicas da doença (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). Assim, pode-se classificar a leishmaniose em dois grandes tipos básicos, de acordo com os sinais e sintomas apresentados: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV).

A LTA subdivide-se em diferentes manifestações clínicas, com sinais e sintomas característicos. A leishmaniose cutânea, causada principalmente por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* no Novo Mundo e por *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica* no Velho Mundo, caracteriza-se

pelo aparecimento de uma ou várias úlceras na pele, que se curam espontaneamente em indivíduos imunocompetentes, embora isso seja um processo lento. A leishmaniose muco-cutânea caracteriza-se pelo surgimento de ulcerações que destroem progressivamente a mucosa, estendendo-se desde o nariz e boca até a faringe e laringe. Este tipo de lesão, causada principalmente por *L. braziliensis*, não sofre remissão espontânea e aparece geralmente meses ou anos após a primeira manifestação de leishmaniose cutânea. A leishmaniose difusa é caracterizada por lesões cutâneas difusas e não ulceradas, ricas em parasitos, que se assemelham às lesões causadas pela hanseníase. Os principais agentes etiológicos causadores deste tipo de leishmaniose são *L. aethiopica* (Velho Mundo) e *Leishmania mexicana* (Novo Mundo) (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; HERWALDT, 1999; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

A LV, também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença. É causada por *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* (*L. infantum*) e *Leishmania tropica* na Europa, Ásia e África, enquanto as espécies *L. infantum* e *Leishmania amazonensis* são as responsáveis pelas infecções nas Américas (BARRAL *et al.*, 1991; HERWALDT, 1999). O tropismo que os parasitos apresentam principalmente pelo fígado, baço e medula óssea é o responsável pelo aparecimento dos sinais e sintomas que caracterizam a LV. As manifestações clínicas aparecem geralmente 3 meses após a infecção. Febre tipicamente noturna, taquicardia, diarreia, tosse, perda de apetite e de peso são os sinais clínicos iniciais. Os achados laboratoriais mais comuns são hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (aumento dos títulos de IgM e IgG). Após o terceiro mês, o fígado aumenta visivelmente de tamanho e a esplenomegalia também é notável. O comprometimento destes órgãos leva às manifestações tardias de caquexia e hiperpigmentação, podendo o indivíduo evoluir a óbito. Na Índia, após tratamento bem sucedido da LV, 3-10% dos pacientes desenvolvem a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), que é caracterizada pelo surgimento de lesões parecidas com verrugas ou nódulos na face e na superfície extensora dos membros. O aparecimento da LDPC pode ocorrer de 6 meses a 3 anos após o tratamento da LV e em pacientes imunocomprometidos, como os infectados pelo vírus da imunodeficiência

humana (HIV). As lesões nodulares que caracterizam a LDPC são altamente infecciosas, pois são ricas em parasitos e constituem um ponto importante no ciclo antroponótico em situações de epidemia (HERWALDT, 1999; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Os sinais clínicos dos diversos tipos de leishmaniose estão representados na Figura 1.

Figura 1: Sinais clínicos da leishmaniose. a – leishmaniose cutânea; b – leishmaniose mucocutânea; c – leishmaniose visceral; d – leishmaniose dérmica pós-calazar (adaptado de CHAPPUIS *et al.*, 2007).



2.1.2 Epidemiologia

A leishmaniose - juntamente com outras doenças como filariose, esquistossomose, doença de Chagas, oncocercose, ascaridíase e hanseníase - é classificada pela OMS como doença tropical negligenciada (DTN) porque se desenvolve principalmente na população em situação de fragilidade econômica e social. Por se tratar de uma DTN, a subnotificação dos novos casos e mortalidade relacionadas à leishmaniose é muito comum nos serviços de saúde dos vários países epidemiologicamente abrangidos pela doença. Isso

ocorre porque a leishmaniose tem focos de distribuição em locais remotos, dificultando a extrapolação para dados oficiais. Alvar e colaboradores (2012) mostraram que atualmente 98 países de 5 continentes apresentam transmissão endêmica de leishmaniose. A contagem oficial dos novos casos indica um crescimento anual de 58.000 casos de leishmaniose visceral e 220.000 casos de leishmaniose tegumentar americana.

Tabela 1: Incidência de leishmaniose visceral notificada e estimada no Brasil e diversas regiões do mundo (adaptada de ALVAR *et al.*, 2012).

	Nº de casos notificados /ano	Período de coleta de dados	Nº de casos estimados /ano
Brasil	3481	2003-2007	4200 a 6300
Índia	34.918	2004-2008	146.700 a 280.800
América	3668	5 anos	4500 a 6800
África Oriental	8569	5 anos	29.400 a 56.700
Mediterrâneo	1800	5 anos	1200 a 2000
Oriente médio e Ásia Central	2496	5 anos	5000 a 10.000
Sul da Ásia	42.623	5 anos	162.100 a 313.600

Por acometer a população em idade produtiva, a leishmaniose gera um importante impacto econômico nos países em que é prevalente. Um DALY (*disability-adjusted life years*) pode ser considerado como sendo um ano de vida saudável perdido. A soma dos DALYs de toda uma população pode ser considerada uma medida da diferença entre o estado de saúde atual e uma situação de saúde ideal, onde toda a população vive até uma idade avançada, livre de doenças e deficiências. Assim, o número de DALYs referente a uma determinada doença em certo período de tempo permite estimar os anos de vida produtiva perdidos em decorrência da mortalidade prematura e da morbidade. De acordo com dados da OMS, estima-se que o número de DALYs para as leishmanioses nas Américas seja de 45.000 (WHO, 2010). A partir destes dados, calcula-se que cada brasileiro acometido pela leishmaniose perde cerca de 10 anos de sua vida produtiva.

2.1.3 Ciclo de vida da *Leishmania*

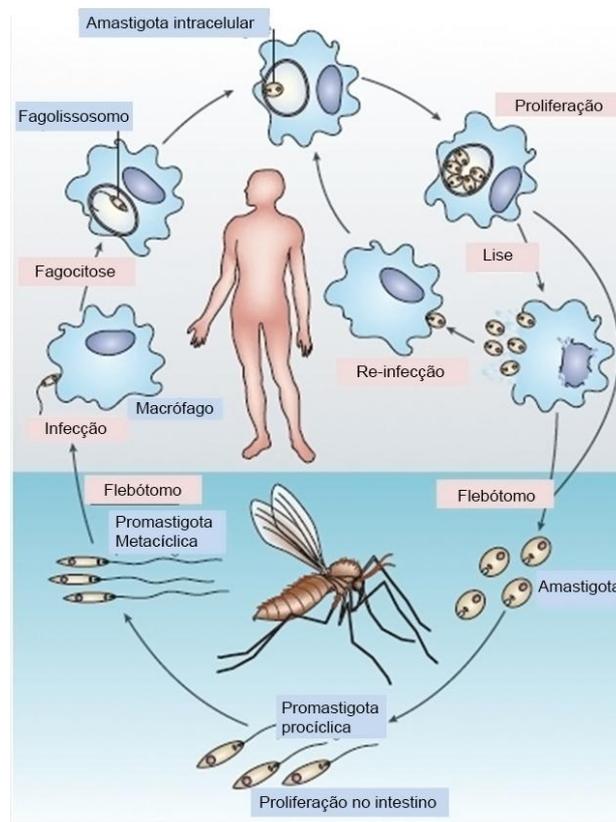
O inseto vetor do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) torna-se infectado durante o repasto sanguíneo em indivíduos infectados (ciclo antroponótico) ou em reservatórios animais (ciclo zoonótico). Esta infecção ocorre devido à ingestão de macrófagos que albergam amastigotas – que são formas intracelulares obrigatórias de 3-7 μ m de diâmetro, as quais são liberadas no estômago do inseto. Imediatamente após a ruptura da célula parasitada, as formas amastigotas transformam-se em formas alongadas (10-20 μ m), extracelulares e flageladas, denominadas promastigotas. Estas novas formas migram para o aparelho digestivo do inseto, onde vivem e se multiplicam por fissão binária.

Uma grande superfície das promastigotas, incluindo o flagelo, é recoberta por uma camada de lipofosfoglicano glicoconjugado (LPG) formando um denso glicocálix. Pequenas diferenças nas moléculas deste envoltório permitem distinguir as promastigotas entre procíclicas e metacíclicas. As promastigotas procíclicas expressam moléculas menores de LPG e, em cultura *in vitro*, são extremamente sensíveis à lise mediada pela via alternativa do complemento. As promastigotas metacíclicas apresentam α -arabinose acoplada aos resíduos de β -galactose terminais do LPG, fazendo com que a cadeia deste constituinte se alongue em duas ou três vezes o tamanho inicial. Além disso, as promastigotas metacíclicas ativam o complemento pela via clássica, mas não sofrem lise. As formas metacíclicas liberadas no intestino médio migram então para a probóscide do inseto, onde poderão infectar novos hospedeiros mamíferos através da saliva inoculada durante um novo repasto sanguíneo (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Uma vez inoculadas no hospedeiro mamífero, as promastigotas são internalizadas pelos macrófagos e se transformam rapidamente em formas amastigotas. A saliva dos flebotomíneos tem a propriedade de inibir seletivamente a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, impedindo assim a morte dos parasitos já internalizados. Assim, as amastigotas conseguem sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos, conduzindo eventualmente à lise dos mesmos. As amastigotas liberadas são capturadas por outros macrófagos e assim o ciclo promove sua continuidade. Em última

análise, na leishmaniose visceral todos os órgãos que contam com grandes concentrações de macrófagos estão infectados, especialmente o fígado, o baço e a medula óssea (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania*. As promastigotas são transmitidas ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos. Após a transmissão, os parasitos são internalizados por células do SFM onde perdem seus flagelos transformando-se em formas amastigotas. A multiplicação das amastigotas destrói a célula hospedeira e, após liberadas, infectam outras células fagocíticas disseminando-se pelo sistema linfático e vascular, infiltrando-se na medula óssea, fígado e baço. Quando um novo flebotomíneo alimenta-se, ocorre sua infecção por ingestão de formas amastigotas. Estas diferenciam-se em promastigotas no estômago dos insetos e evoluem para formas infectantes – metacíclicas – que infectarão novo hospedeiro mamífero em um próximo repasto sanguíneo. Adaptado de CHAPPUIS *et al.*, 2007.



2.1.4 Modelo murino de leishmaniose

O uso de animais de laboratório continua sendo a melhor alternativa para a caracterização de doenças e avaliação do impacto das mesmas sobre o hospedeiro. O principal pré-requisito para a escolha de um modelo animal é haver correspondência da fisiologia do animal em questão com a fisiologia humana, ao mesmo tempo em que é importante que o mesmo seja de fácil manuseio (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). No caso da LV, sua evolução no modelo animal depende de diversos fatores, como a espécie de *Leishmania* causadora da infecção, a concentração de parasitos no inóculo e a via de administração do mesmo, bem como o estado imunológico e a genética do hospedeiro (NIETO *et al.*, 2011). Está bem documentado que a resposta imune mediada por células Th1 é o evento que impede que a infecção por *Leishmania* ocorra. Intermediados pelo interferon gama (IFN- γ), os macrófagos são ativados a destruírem os parasitos em seu interior. Por sua vez, camundongos BALB/c infectados montam uma resposta precoce do tipo Th2 com secreção de citocinas IL-4, IL-5 e/ou IL-13 frente à infecção por *L. major*, e isso faz com que haja não remissão das lesões, com conseqüente exacerbação da doença (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Os camundongos BALB/c são inicialmente suscetíveis à infecção por *L. donovani*, entretanto, nos estágios tardios pós-infecção, os animais são capazes de controlar a carga parasitária do fígado, eliminando-a deste órgão durante a infecção crônica. Tal como relatado em estudos experimentais utilizando camundongos BALB/c, alguns dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento das respostas imunes órgão-específicas que induzem à depuração do parasito no fígado têm sido descobertos. Nestes animais, o controle da infecção visceral está associado ao desenvolvimento de respostas imunes parasito-específicas mediadas por linfócitos T auxiliares e citotóxicos, à produção de IFN- γ pelos linfócitos T do baço e à formação de granulomas hepáticos. Após a infecção, as amastigotas intracelulares multiplicam-se rapidamente, mas este crescimento é contido. A persistência das amastigotas no interior dos macrófagos induz uma inflamação granulomatosa no tecido hepático, a qual pode facilitar o controle da infecção. Ao contrário do fígado, o

baço e a medula óssea permanecem como sítios de infecção crônica por toda a vida do animal. No baço, há ausência de resposta inflamatória provavelmente devida a uma falha na ativação de mecanismos leishmanicidas e falta de quimiocinas liberadas pelos macrófagos (CARRIÓN *et al.*, 2006).

2.1.5 Leishmaniose e tratamento

Apesar de não haver ainda cura para a leishmaniose, a mesma possui tratamento para os sinais clínicos. Porém, a terapia leishmanicida é um assunto que gera divergências de opiniões entre os profissionais de saúde, em grande parte devido à complexidade da doença e também às informações insuficientes publicadas com relação à mesma. A infinidade de relatórios baseados em dados incompletos e subestimados cria a ilusão de que existem excelentes opções de tratamento. Desafortunadamente, os medicamentos mais eficazes no tratamento da leishmaniose são os que possuem efeitos tóxicos mais acentuados e também os de sistema posológico mais complexo (HERWALDT, 1999).

Os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da LV consistem nos antimoniais pentavalentes, AnB, paramomicina e miltefosina (HERWALDT, 1999; CROFT, 2001; CHAPPUIS *et al.*, 2007; WHO, 2010). Os antimoniais pentavalentes são a primeira linha de tratamento para a LV há mais de 70 anos em diversas áreas do mundo, incluindo o Brasil. Ao mesmo tempo, são fármacos que possuem alta toxicidade e que apresentam efeitos adversos considerados graves, como arritmia e pancreatite aguda. Além disso, pacientes com idade abaixo de 2 anos ou acima de 45 que possuam sinais de leishmaniose muito avançada e/ou desnutrição severa apresentam alto risco de morte durante o tratamento com antimoniais. Nestes casos, o risco se deve à toxicidade do fármaco, à lenta melhora do paciente, às complicações da LV ou até mesmo a uma combinação de todos estes fatores (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

A AnB é o fármaco de segunda escolha para o tratamento da LV no Brasil e tem substituído os antimoniais em regiões da Índia onde a falha terapêutica com estes alcança mais de 60% dos casos (CHAPPUIS *et al.*, 2007). As formulações contendo AnB vêm sendo usadas progressivamente e são consideradas os tratamentos mais eficazes contra a LV, agindo tanto

contra as formas amastigotas quanto contra promastigotas e alcançando uma taxa de cura de 97% (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011). Entretanto, o tratamento com a AnB convencional possui diversos inconvenientes: o medicamento possui um alto custo, o regime posológico exige internação do paciente (15 infusões intravenosas lentas em dias alternados), além de efeitos adversos graves como hipocalcemia, nefrotoxicidade e anafilaxia. Por isso a formulação de AnB lipossomal, que apresenta efeitos adversos mais brandos, tem se apresentado como a melhor alternativa para o tratamento da LV, sendo adotada como primeira escolha na Europa e Estados Unidos. Entretanto, seu uso ainda é limitado pelo alto custo em países em desenvolvimento (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

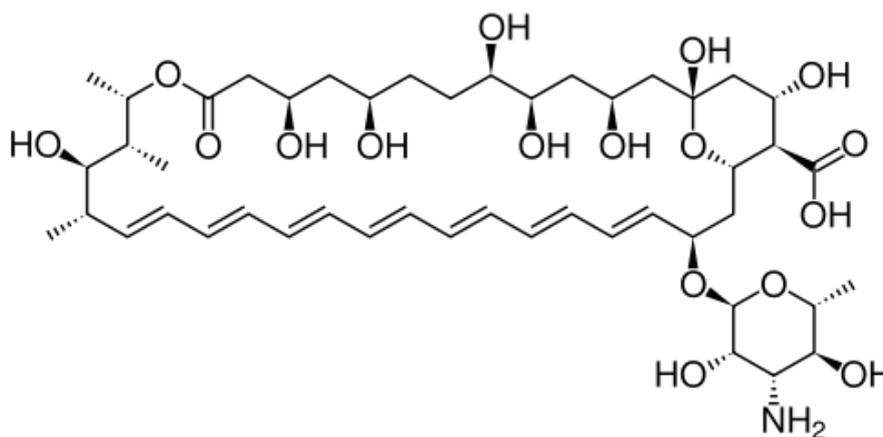
A miltefosina, inicialmente desenvolvida como fármaco anticâncer, é a única substância ativa administrada por via oral para tratamento da LV. Os efeitos adversos relatados no uso deste fármaco incluem toxicidade gastrointestinal, hepática e renal, além de teratogenia. A resistência do parasito à miltefosina pode ser facilmente induzida *in vitro*. Além disso, o crescente uso da miltefosina no tratamento da leishmaniose canina na Europa pode ser uma das causas do desenvolvimento da resistência da *L. infantum* ao fármaco (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

A paramomicina é um antibiótico parenteral da classe dos aminoglicosídeos com boa atividade leishmanicida expressa tanto na LV quanto na LTA (HERWALDT, 1999; CROFT, 2001; CHAPPUIS *et al.*, 2007). O fármaco apresenta ainda bons resultados quando administrado em pacientes que possuem parasitos resistentes aos antimoniais pentavalentes. Diversas combinações de paramomicina com antimoniais pentavalentes têm sido testadas a fim de se estabelecer uma terapia mais eficaz contra a LV e LTA, visando assim o aumento da resposta imunológica e a redução do tempo de tratamento. Entretanto, pacientes infectados com algumas espécies de *Leishmania* não respondem satisfatoriamente a este tipo de tratamento (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1988).

2.2 Anfotericina B

A AnB é um antibiótico macrolídeo poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* e foi inicialmente isolada na década de 50 (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Introduzida no mercado em 1958 na forma de desoxicolato (Fungizone[®]), a AnB é, ainda hoje, o fármaco de escolha para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e tem sido utilizada também nos casos de LV resistente ao tratamento com antimoniais (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011). A Figura 3 ilustra a estrutura da AnB, onde é possível observar na porção superior da representação, os múltiplos grupos hidroxila que conferem a característica hidrofílica à molécula. Na porção inferior, pode-se notar a extensa cadeia carbônica com duplas ligações conjugadas não substituídas que lhe conferem sua característica hidrofóbica. O nome anfotericina deriva da característica anfotérica de sua estrutura molecular, formando sais solúveis tanto em meio ácido como em meio básico (ASHER; SCHURARTZMAN, 1977). No entanto, estes sais apresentam uma atividade antifúngica menor que a substância original (PLUMB, 1999).

Figura 3: Estrutura química da anfotericina B (GANIS *et al.*, 1971; adaptada em ChemDraw, 2004).



Na Tabela 2 são apresentados dados de solubilidade da AnB em alguns solventes. Com exceção do dimetilsulfóxido (DMSO) e da dimetilformamida, a AnB é praticamente insolúvel em soluções aquosas de pH neutro (ASHER; SCHURARTZMAN, 1977). Sua solubilidade em água no pH fisiológico (pH 6 –

7) é menor que 1mg/L. Torna-se solúvel em meio aquoso com pH abaixo de 2 ou acima de 11 (TORRADO *et al.*, 2008), porém nessas condições extremas, o fármaco não é estável (BENNETT, 1995). A solubilidade da AnB em água pode ser aumentada por adição de lauril sulfato de sódio ou desoxicolato de sódio. A AnB também é solúvel em vesículas de lecitina e colesterol e em esteróides constituintes de membranas naturais (ASHER; SCHURARTZMAN, 1977).

Tabela 2: Solubilidade da anfotericina B (adaptada de ASHER; SCHURARTZMAN, 1977).

Solvente	Solubilidade da AnB em mg/mL
Dimetilsulfóxido	30 – 40
Formamida	6,4
Etilenoglicol	2,6
Dimetilformamida	2 – 4
Ácido acético	1 – 2
Propilenoglicol	1 – 2
Piridina	1,75
Metanol*	1,6
Álcool isoamílico	1,05
Água	0,75
Álcool benzílico	0,75
1,4-dioxano	0,55
Etanol	0,50
Etil-éster	0,50
Acetona	0,35
Acetato de etila	0,30
Cloro-etileno	0,30
Acetato isoamílico	0,30
CS ₂	0,24
Etil-metilcetona	0,16
Álcool isopropílico	0,11
CHCl ₃	0,08
Benzeno	0,06
Cicloexano	0,02

CCl ₄	0,002
Tolueno	0,0
Isocetano	0,0

*Em metanol anidro, a solubilidade é de 0,2 – 0,4 mg/mL.

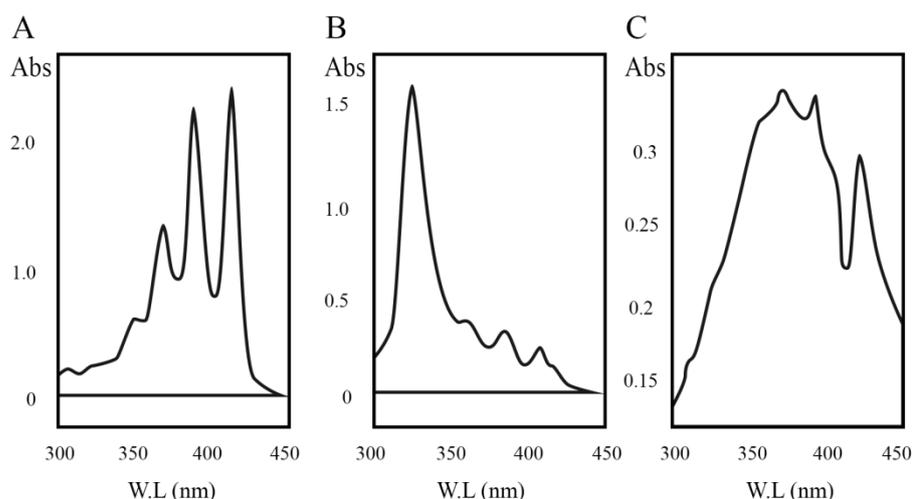
Devido à sua natureza anfífila, acima de uma determinada concentração limite as moléculas de AnB se autoassociam formando agregados. Esses agregados são formados em meio aquoso numa concentração em torno de 0,2 µg/mL através da interação entre as cadeias poliênicas de moléculas vizinhas (MILHAUD *et al.*, 2002). Portanto, a AnB em meio aquoso forma uma mistura de monômeros solúveis e oligômeros com agregados insolúveis. Embora todas as formulações de base aquosa de AnB tenham coloração amarelada, as mesmas podem apresentar diferentes aspectos dependendo do estado de agregação das moléculas. A formulação onde há prevalência da conformação monomérica apresenta-se como uma dissolução transparente completa; a que apresenta oligômeros mostra-se como uma dispersão coloidal translúcida; e a alta agregação de oligômeros produz uma suspensão opaca (TORRADO *et al.*, 2008).

Através da espectrofotometria de absorção na faixa do ultravioleta-visível (UV-Vis), é possível determinar o estado de agregação das moléculas de AnB em diferentes formulações. As espécies apresentam diferentes comportamentos, como pode ser observado na Figura 4. A Tabela 3 apresenta um sumário das principais características das formulações contendo os diferentes estados de agregação da AnB.

Tabela 3: Características dos diferentes estados de agregação da anfotericina B (adaptado de TORRADO *et al.*, 2008).

Estado de agregação da AnB	Aparência macroscópica da formulação	Picos no espectro de absorção UV-Vis
Monômero	Amarelo transparente	363, 383, 406-409 nm
Oligômero	Amarelo translúcido	328-340 nm
Agregado de oligômero	Amarelo opaco	360-363, 383-385 e 406-420 nm

Figura 4: Perfis espectrofotométricos dos diferentes estados de agregação da anfotericina B. (A) Espécie monomérica. (B) Espécie oligomérica. (C) Agregados de oligômeros (adaptado de TORRADO *et al.*, 2008).



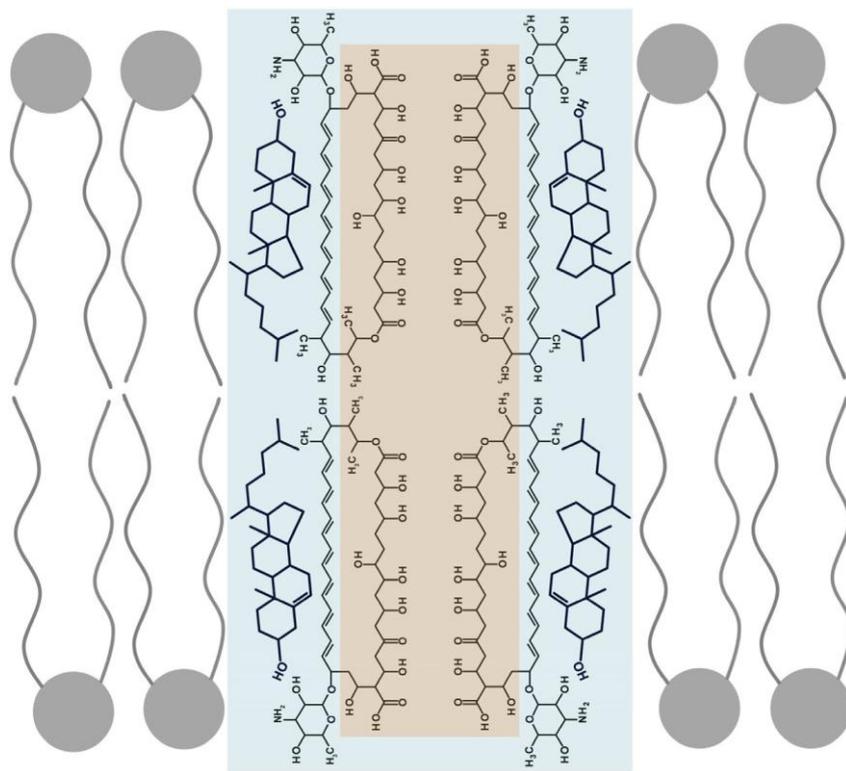
Numa mesma formulação podem estar presentes os diversos estados de agregação. A proporção de cada espécie nas formulações depende de diferentes fatores: concentração de AnB, meio de dispersão do fármaco, interação com surfactantes e outros excipientes, maneira como as dispersões são preparadas ou até mesmo a temperatura a que as formulações são expostas (TORRADO *et al.*, 2008).

A seletividade da AnB está relacionada com sua interação preferencial com esteróis substituídos no carbono 24, tais como o ergosterol e o episterol,

os quais são encontrados nas membranas celulares dos fungos e nos protozoários do gênero *Leishmania*, respectivamente. Entretanto, é comum ocorrer danos à membrana das células do hospedeiro, uma vez que a AnB pode também associar-se ao colesterol – esterol constituinte da membrana celular de mamíferos – e a este fato atribui-se sua toxicidade (MULLEN; CARTER; BAILLIE, 1997). A ausência de esteróis na membrana celular de bactérias explica a incapacidade da AnB em inibir o crescimento bacteriano (ASHER; SCHURARTZMAN, 1977).

No microambiente celular, ocorre interação de Van der Waals entre a face poliênica hidrofóbica da AnB e as cadeias carbônicas dos esteróis que compõem a membrana celular. A face poli-hidroxilada da AnB fica voltada para o centro do agregado molecular, e como ocorre repulsão entre as porções hidrofílicas de suas moléculas, formam-se poros na membrana celular (MULLEN; CARTER; BAILLIE, 1997), como pode ser observado na representação da Figura 5. A alteração da permeabilidade celular favorece a saída de pequenos íons e metabólitos, levando à morte celular (BOLARD; JOLY; YENI, 1993).

Figura 5: Representação esquemática da formação de poros hidrofílicos na membrana celular devido à associação entre anfotericina B e esteróis presentes na membrana (adaptada de CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011).



A AnB, tanto na forma monomérica quanto agregada, pode formar canais em membranas contendo ergosterol, mas somente a forma agregada integra tais canais em membranas contendo colesterol (HUANG *et al.*, 2002). A maior afinidade por ergosterol pode ser demonstrada em estudos nos quais a concentração de AnB necessária para promover permeabilidade foi dez vezes menor para vesículas contendo ergosterol do que para aquelas com colesterol (VERTUT-CROQUIN *et al.*, 1983; SAINT-PIERRE-CHAZALET *et al.*, 1988). Através destes estudos, verificou-se que a AnB na forma monomérica é menos tóxica que as demais e ainda assim conserva seu mecanismo de ação (MULLEN; CARTER; BAILLIE, 1997).

As reações adversas agudas à AnB tais como febre, calafrios, tremores, náusea, vômitos e dor de cabeça ocorrem frequentemente e estão principalmente relacionadas à forma de administração da mesma: infusão lenta via intravenosa (SCHÖFFSKI *et al.*, 1998; NUCCI *et al.*, 1999; WALSH *et al.*, 1999; MORA-DUARTE *et al.*, 2002). Alterações cardiovasculares como

hipotensão, hipertensão e arritmia cardíaca foram observadas com menor frequência (WALSH *et al.*, 1999; MORA-DUARTE *et al.*, 2002). Hipocalemia, hipernatremia, diurese aumentada, hipomagnesemia, disfunção renal e efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia) estão associados com administrações de repetidas doses (SCHÖFFSKI *et al.*, 1998; GERBAUD *et al.*, 2003).

A AnB possui alta nefrotoxicidade, de modo que os pacientes podem apresentar algum grau de disfunção renal após tratamento com este fármaco (SCHÖFFSKI *et al.*, 1998; WALSH *et al.*, 1999; MORA-DUARTE *et al.*, 2002).

Os efeitos neurotóxicos em pacientes tratados com infusão endovenosa de AnB são raros. Alguns estudos observaram hipertermia, confusão mental, depressão, delírio, comportamento psicótico, convulsão, tremores, perda de audição, opacidade da visão, dentre outras alterações acompanhadas por degeneração da bainha de mielina (RACIS *et al.*, 1990).

A cardiotoxicidade foi descrita especialmente pela indução de arritmia ventricular, secundária à hipocalemia em pacientes com função renal diminuída, que são suscetíveis a essa alteração eletrolítica (CRAVEN, GREMILLION, 1985; SCHÖFFSKI *et al.*, 1998). Sua ocorrência é rara se o balanço eletrolítico for mantido, mas para a maioria dos pacientes, a manutenção requer suplementação com potássio e magnésio (BARTON; PAHL; VAZIRI, 1984). Ainda assim, alguns autores observaram a persistência de arritmia mesmo após suplementação (SCHÖFFSKI *et al.*, 1998).

2.2.1 Nanoformulações de anfotericina B

Com o advento da nanotecnologia, muitas preparações farmacêuticas lipossomais foram desenvolvidas para veicular fármacos. Assim, três formulações lipídicas de AnB são comercializadas desde a segunda metade dos anos 90: AmBisome[®], Abelcet[®] e Amphocil[®], que diferem entre si na estrutura, forma, tamanho, composição lipídica e conteúdo de AnB. Estas formulações são capazes de modificar a distribuição da AnB no organismo, reduzindo os efeitos tóxicos observados no tratamento com a formulação convencional, desoxicolato de AnB - Fungizone[®], na qual está presente

predominantemente a forma oligomérica da AnB (TORRADO *et al.*, 2008). As formulações lipossomais liberam a AnB mais lentamente no organismo e ainda impedem a formação de agregados, o que pode explicar sua reduzida toxicidade.

A grande vantagem observada em estudos clínicos é que, quando veiculadas em formulações lipídicas, altas doses de AnB podem ser toleradas pelo paciente, podendo-se aumentar a eficácia do tratamento. Entretanto, efeitos indesejáveis como febre, calafrio, rigidez, sonolência, discreta elevação dos marcadores da função hepática, disfunção renal e toxicidade cardiopulmonar foram documentadas em pacientes que receberam AmBisome[®] (WALSH *et al.*, 1998).

Deve-se ressaltar que a administração destas formulações ainda exige a internação do paciente, o que torna o tratamento dispendioso e muitas vezes inviável, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a LV é prevalente.

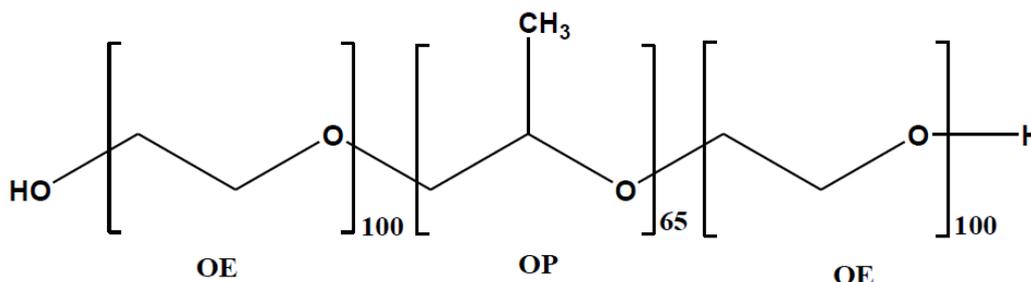
2.3 Pluronic[®] F-127

Vários tipos de copolímeros vêm sendo utilizados para preparar micelas poliméricas. Entretanto, na aplicação clínica, os requisitos de biocompatibilidade e biodisponibilidade limitam a escolha de diversos copolímeros. Os três copolímeros mais importantes da atualidade são caracterizados pela presença de um bloco hidrofóbico constituído de óxido de polipropileno, poliamidas ou poliésteres (DOUROUMIS; FAHR, 2013). A automontagem de micelas executada pelos copolímeros pode ser a chave para a fabricação de partículas inteligentes em escala nanométrica e dispositivos para fins biomédicos. Assim, a aplicação destas partículas como veículos para o controle da liberação de fármacos tem sido amplamente estudada (ZHANG *et al.*, 2009).

Introduzida na década de 50 sob o nome de poloxâmero, esta classe de copolímeros em bloco vem sendo largamente estudada e consiste em arranjos estruturais em tribloco (OE-OP-OE) formados pelo óxido de etileno (OE) nas extremidades e óxido de propileno (OP) na parte central, como pode ser

observado na Figura 6. Alguns polímeros desta família são descritos nas farmacopeias americana e europeia (ROWE *et al.*, 2005) e são comercializados sob os nomes Pluronic[®], Synperonic[®], Tetronic[®], dentre outros (KABANOV *et al.*, 2002). O poloxâmero 407 ou Pluronic[®] F-127 (F127) tem peso molecular de 12.600 daltons (DUMORTIER *et al.*, 2006; TAKÁTS; VÉKEY; HEGEDÜS, 2001). Sua fórmula molecular é OE₉₅₋₁₀₅ – OP₅₄₋₆₀ – OE₉₅₋₁₀₅. A 22 °C, seu equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) é 22 (KABANOV *et al.*, 2002), sendo portanto classificado como um tensoativo hidrofílico. A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso do F127 como excipiente para diversos tipos de formas farmacêuticas, dentre elas as soluções orais, preparações injetáveis, soluções para inalação, suspensões, formulações oftálmicas e tópicas (SCHMOLKA, 1991).

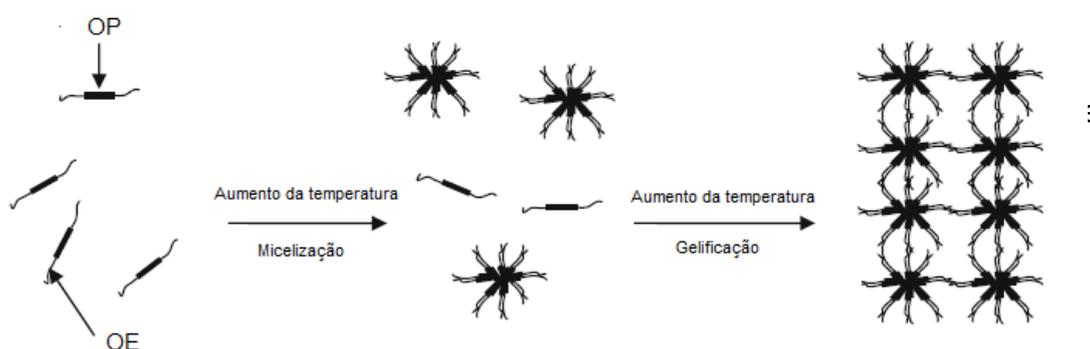
Figura 6: Copolímero em bloco Pluronic[®] F-127 – dois blocos hidrófilicos de óxido de etileno e um bloco hidrofóbico de óxido de propileno (KABANOV *et al.*, 2002, adaptado em ChemDraw, 2004).



Uma propriedade importante deste copolímero é que suas soluções aquosas com concentração igual ou maior que 20% são líquidos micelares a baixas temperaturas que se transformam em géis semirrígidos com o aumento da temperatura acima de 25°C (SCHMOLKA, 1991). Esta propriedade termorreversível permite que cada formulação, de acordo com a concentração do polímero e de aditivos, possa apresentar uma temperatura de transição específica do estado de solução (T_{sol}) para o estado gel (T_{gel}). Este fenômeno de transição sol-gel dependente de temperatura deve-se às interações entre diferentes segmentos do copolímero (DUMORTIER *et al.*, 2006). À medida que

a temperatura aumenta, a porção hidrofóbica OP das moléculas se agrega em micelas devido à desidratação, sendo circundada pelas porções hidrofílicas OE (JUHASZ *et al.*, 1989). Uma representação esquemática deste processo é apresentada na Figura 7.

Figura 7: Representação esquemática dos mecanismos de associação do Pluronic® F-127 em água (adaptada de DUMORTIER *et al.*, 2006).



Outras características importantes destas soluções são dar estabilidade a proteínas e peptídeos incorporados em suas matrizes, com completa recuperação de sua atividade quando o gel é dissolvido em excesso de solução tampão (STRATTON *et al.*, 1997), e sua tendência a aderir a superfícies, tais como a pele (LEE *et al.*, 1997) e a mucosa do intestino (CHOI *et al.*, 1998). Sendo assim, formulações contendo micelas de F127 têm sido usadas como veículos a fim de melhorar a biodisponibilidade de substâncias que possuem baixas solubilidade e permeabilidade (BARICHELLO *et al.*, 1999). Desta forma, a veiculação de AnB, uma molécula anfótera, em soluções de F127 nos parece uma estratégia interessante, pois além de estabilizar o fármaco, essa matriz poderia melhorar a biodisponibilidade do mesmo e possibilitar sua administração por uma via alternativa à parenteral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliação do efeito leishmanicida de formulações de F127 contendo AnB após múltiplas administrações subcutâneas em camundongos BALB/c previamente infectados com *Leishmania infantum*.

3.2 Objetivos específicos

- Produção e caracterização físico-química de soluções de F127 contendo AnB;
- Avaliação do efeito anti-parasitário das formulações obtidas no fígado, baço e medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*;
- Avaliação da toxicidade das formulações obtidas no fígado e nos rins de camundongos BALB/c sadios e infectados com *Leishmania infantum* através de dosagens bioquímicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Pluronic[®] F-127 (F127), anfotericina B (AnB), DMEM e *Grace's Insect Medium* foram adquiridos da Sigma Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). Dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfatodissódico anidro e cloreto de sódio para constituição do tampão pH=7,4 foram adquiridos da Merck[®] (Darmstadt, Alemanha). A solução de hidróxido de sódio 1,0M foi adquirida da Cromoline[®] (Diadema, SP, Brasil) e a solução de ácido clorídrico 1,0M da Synth[®] (Diadema, SP, Brasil). Soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da LGC[®] (Cotia, SP, Brasil). A L-glutamina foi adquirida da Gibco BRL[®] (Grand Island, NY, EUA) e a penicilina G da USB Corporation[®] (Cleveland, OH, EUA). Cloridrato de cetamina foi adquirido da empresa Syntec[®] (Cotia, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina da Sespo Indústria e Comércio/LTDA (Paulínia, SP, Brasil).

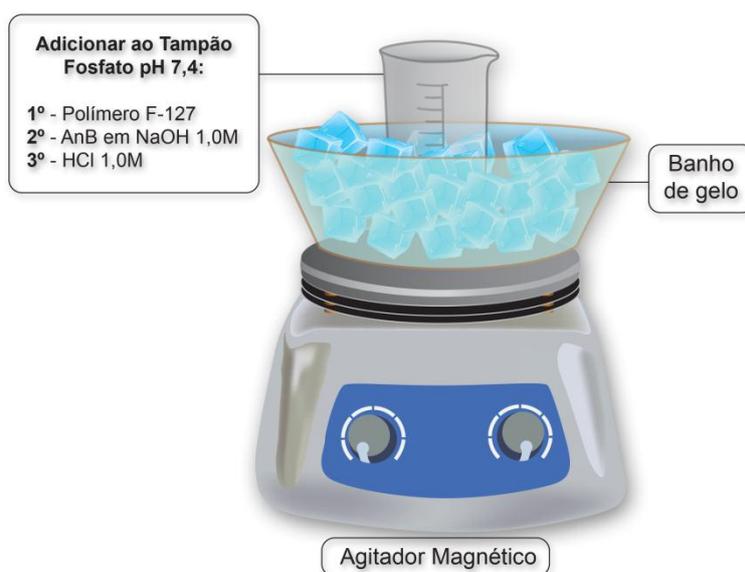
Os reagentes utilizados para as dosagens bioquímicas (métodos cinéticos de dosagem de aspartato cetoglutarato aminotrasferase, alanina cetoglutarato aminotransferase, creatinina e uréia) foram gentilmente cedidos pela Bioclin[®] – Quibasa, através do programa “Bioclin[®] nos Laboratórios Científicos”.

4.2 Desenvolvimento das formulações de F127 contendo anfotericina B

O veículo utilizado nas formulações deste trabalho foi desenvolvido previamente pelo grupo de pesquisa. Esse veículo, composto por F127 e tampão, serviu como base para que se desenvolvesse diversas formulações, variando-se a concentração dos componentes. Assim, uma quantidade precisamente pesada de F127 foi adicionada lentamente sob agitação moderada e em banho de gelo (4 - 8°C) a um béquer contendo solução de tampão fosfato pH 7,4 até completa dissolução do polímero (BARICHELLO *et al.*, 1999). A AnB foi precisamente pesada, adicionada a um microtubo e solubilizada em 400µL de hidróxido de sódio 1,0M e adicionada à solução de

F127. Em seguida, quantidade suficiente de ácido clorídrico 1,0M foi adicionada diretamente à solução de F127 com a finalidade de neutralizar o componente básico adicionado à formulação. A concentração final de F127 na formulação foi de 16% p/p. A Figura 8 é uma representação esquemática do modo de preparo da formulação.

Figura 8: Representação esquemática do aparato usado no preparo da formulação.

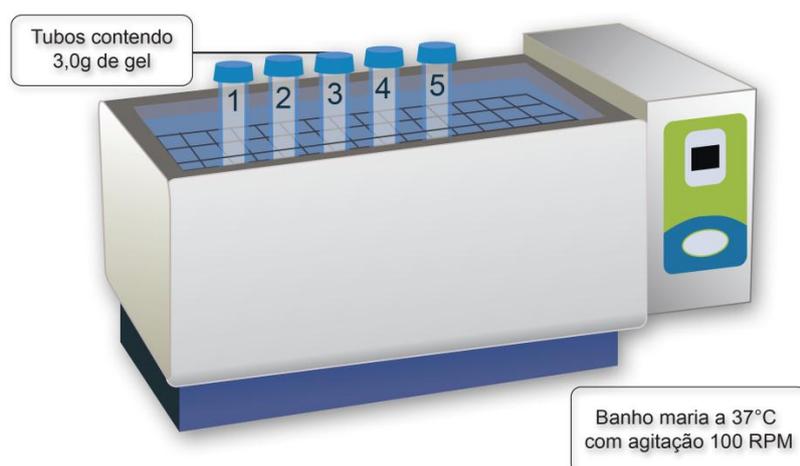


4.3 Estudo de liberação *in vitro* de anfotericina B da formulação de F127 a 16% no estado gel.

Um modelo de dissolução sem membrana foi utilizado para os estudos de liberação *in vitro* da AnB presente na formulação de F127 a 16% no estado gel (BARICHELLO *et al.*, 1999). 3,0 g da solução de F127 contendo AnB descrita no subitem 4.2 foram transferidos para tubos falcon de fundo chato. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C (Banho Dubnoff 304D, Nova Ética[®], Brasil) por 10 min para que a formulação gelificasse. Em seguida, 1,0 mL de tampão fosfato pH 7,4 pré-aquecido a 37°C, foi cuidadosamente depositado sobre a superfície do gel e os tubos foram recolocados no banho-maria. Os tubos foram então agitados horizontalmente na velocidade de 100 rpm e, de hora em hora, o sobrenadante foi completamente removido com o auxílio de uma pipeta. A cada coleta, um mililitro de tampão fosfato pH 7,4 a 37°C foi recolocado sobre a superfície do gel, de modo a manter as mesmas

condições experimentais pelo período de 5 horas. As amostras coletadas foram analisadas por espectroscopia UV (Espectrofotômetro Ultravioleta-Visível Helios α – Thermo Electron Corporation) no comprimento de onda de 380 nm para quantificar a AnB liberada da formulação em teste. A Figura 9 representa o esquema experimental utilizado no estudo de liberação de AnB da formulação de F127 a 16% no estado gel. Os dados de liberação foram expressos como a média \pm desvio padrão. O ensaio foi realizado em quintuplicata para estimativa do erro experimental.

Figura 9: Representação esquemática do aparato utilizado no estudo de liberação de anfotericina B da formulação de F127 a 16% no estado gel.



4.4 Estudo de estabilidade da anfotericina B no estado sol e gel da formulação de F127

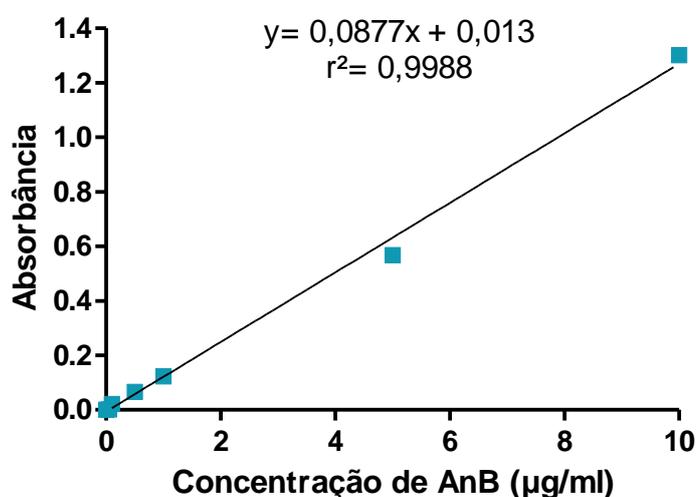
Foram preparados 50g da formulação de F127 contendo 92,5 μ g de AnB por grama de gel, conforme metodologia descrita no subitem 4.2. A formulação foi dividida em porções de 1g e as mesmas foram colocadas em microtubos, os quais foram devidamente identificados e armazenados sob duas condições: à temperatura ambiente (25°C, estado gel) e à baixa temperatura em geladeira (4°C, estado sol). Em intervalos de tempo definidos, as amostras foram preparadas pesando-se aproximadamente 500mg da formulação contida no

microtubo. Cada amostra foi diluída em metanol para um volume final de 10 mL. A AnB na amostra foi quantificada pela determinação da absorbância da amostra no comprimento de onda de 380 nm em espectrofotômetro UV/Vis. Os valores de absorbância obtidos foram plotados na equação de reta obtida da curva de calibração da AnB em metanol conforme descrito no subitem 4.5. A estabilidade da AnB no estado sol e gel da formulação de F127 a 16% foi avaliada pelo período de 360 dias.

4.5 Quantificação da anfotericina B por espectroscopia no UV

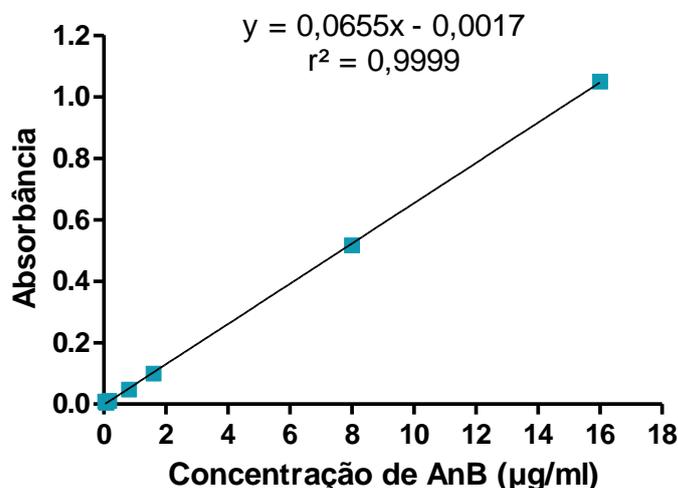
Para quantificação da AnB foram preparadas duas curvas de calibração. Para o estudo de liberação da AnB da formulação de F127 no estado gel foi preparada uma curva de calibração em PBS pH 7,4. As concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10 µg de AnB por mL foram preparadas e a absorbância destas soluções determinadas por espectroscopia na região do UV no comprimento de onda de 380 nm. A faixa de concentração do padrão de AnB utilizado foi suficiente para que todos os valores obtidos na leitura das amostras se encontrassem dentro da linearidade do experimento. A curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação da AnB dispersa em tampão fosfato pH 7,4 estão representados na Figura 10. A equação da reta obtida da curva de calibração foi utilizada na quantificação da AnB nas amostras do estudo de liberação. O coeficiente de correlação obtido para a curva de calibração foi de 0,9988.

Figura 10: Curva de calibração e equação de reta do padrão de anfotericina B em tampão fosfato pH= 7,4.



Para o estudo de estabilidade da AnB na formulação de F127 no estado sol e gel foi preparada uma curva de calibração em metanol. Soluções metanólicas de AnB nas concentrações de 0,2; 0,8; 1,5; 8,0 e 16,0 µg/mL foram preparadas e a absorbância destas soluções foram determinadas por espectroscopia na região do UV no comprimento de onda de 380 nm. A faixa de concentração do padrão de AnB utilizado foi suficiente para que todos os valores obtidos na leitura das amostras se encontrassem dentro da linearidade do experimento. Um exemplo de curva de calibração, da equação de reta e do coeficiente de correlação da AnB em metanol está representada na Figura 11. O coeficiente de correlação obtido para a curva de calibração foi 0,999. A equação da reta obtida da curva de calibração foi utilizada na quantificação da AnB nas amostras do estudo de liberação.

Figura 11: Curva de calibração e equação da reta do padrão de anfotericina B em metanol.



4.6 Análise do tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das micelas/partículas das formulações de F127 contendo anfotericina B

As formulações de F127 contendo 150 e 300µg de anfotericina B por mL foram obtidas conforme descrito no subitem 4.2. O tamanho médio, o potencial zeta e o índice de polidispersão das micelas/partículas presentes nestas formulações foram determinados através do equipamento *Nanosizer N5 Submicron Particle Size Analyser* (Beckman Coulter®, EUA). Para a análise, alíquotas das formulações foram coletadas e diluídas convenientemente com água ultrapura. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo e submetidas à leitura no equipamento descrito acima. O ângulo de espalhamento incidente utilizado foi de 90°. As leituras foram feitas em triplicata.

4.7 Cepa de *Leishmania infantum*

Neste trabalho utilizou-se uma cepa selvagem de *L. infantum* isolada de cão sintomático, denominada de C43 e caracterizada por *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). Esta cepa foi

gentilmente cedida pelo Professor Dr. Alexandre Barbosa Reis, do Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) – Cipharma – Universidade Federal de Ouro Preto.

4.8 Manutenção da cepa C43 e curva de crescimento

A cepa C43 de *L. infantum* foi cultivada em meio *Grace's* 10% de SFB, pH= 6,5, o qual é constituído de *Grace's Insect Medium*, 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), 2 mM de L-glutamina e 100 U/mL de penicilina G. A cultura foi mantida em estufa com controle de temperatura a $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Para obtenção da curva de crescimento, iniciou-se uma nova cultura com 1×10^5 parasitos/mL que foi mantida sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os parasitos foram diluídos em formalina 4% e quantificados diariamente através da contagem em câmara de Neubauer durante o período de 10 dias.

4.9 Infecção experimental por *Leishmania infantum*

O cálculo para definir a quantidade de animais em cada grupo experimental foi realizado através do programa BioEstat[®], versão 2007. Trinta fêmeas de camundongos BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas foram inoculadas através da veia caudal com 1×10^7 parasitos na forma promastigota em início de fase estacionária. Para isso, os parasitos foram lavados com tampão fosfato pH= 7,2 (PBS) e centrifugados (1540 x g por 10 minutos a 4°C) por três vezes. A quantidade de parasitos presentes na solução foi estimada através da contagem em câmara de Neubauer e ajustada para conter 1×10^7 parasitos/200 μL de inóculo. A aquisição e manutenção dos animais foram feitas através do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Após a infecção, os animais foram mantidos no setor de experimentação em isogênicos, alojados 3 a 3 em gaiolas, mantidos em temperatura entre 21 e 25°C em ciclo de claro e escuro de 12h, com água e ração *ad libitum*. Esta fase do trabalho seguiu as normas estipuladas pela CEUA/UFOP, estando de acordo com o Código Brasileiro de Experimentação Animal.

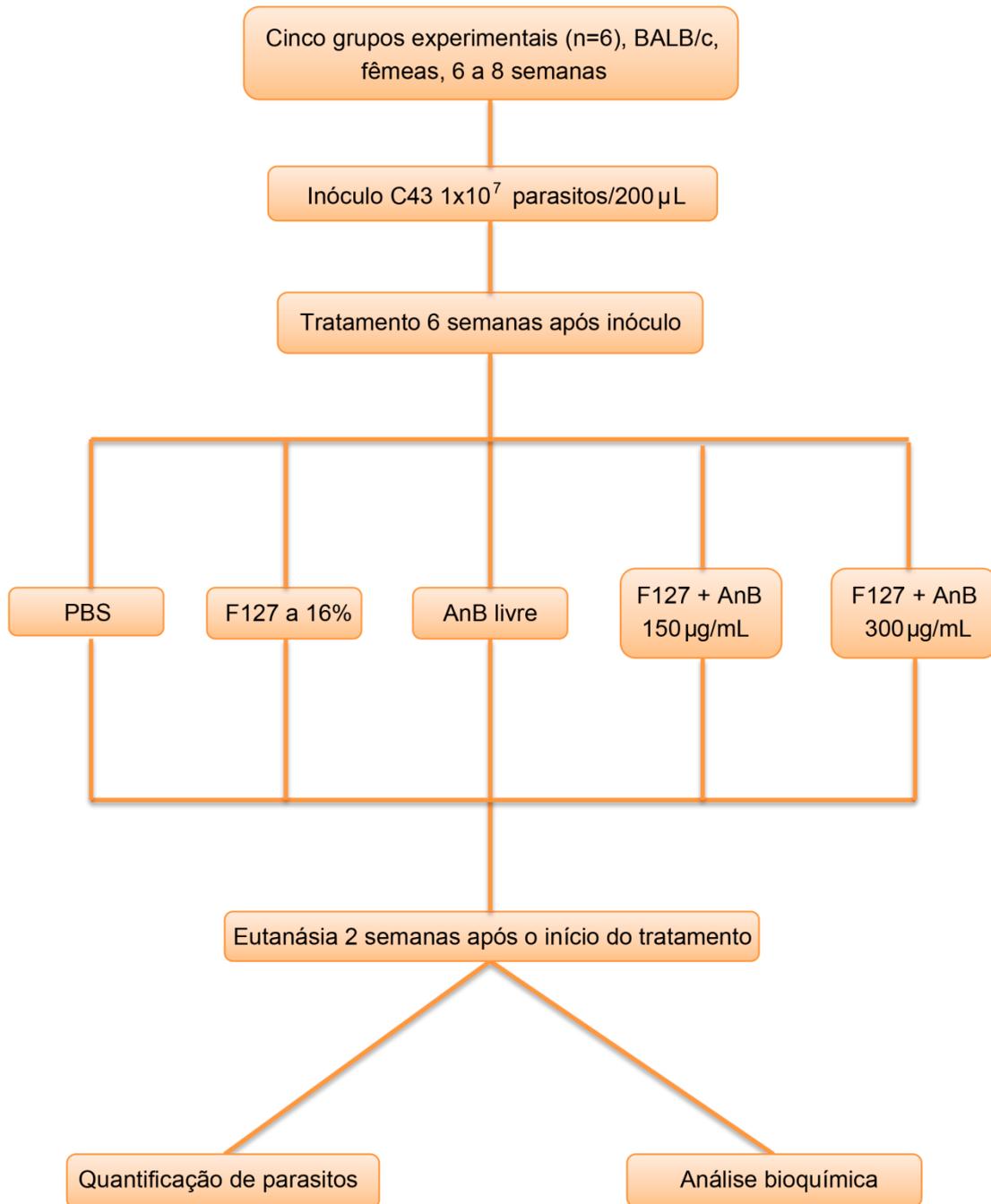
A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP aprovou a realização deste estudo sob o protocolo nº 2012/72.

4.10 Tratamento

Anteriormente, foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa um trabalho a fim de avaliar o tropismo tecidual da cepa C43 de *L. infantum*. A partir desses resultados obtidos previamente, foi possível determinar os tempos experimentais necessários para a realização deste trabalho. A quantidade de AnB a ser adicionada às formulações para realização do tratamento *in vivo* deste trabalho foi determinada através de um pequeno estudo piloto, onde foram testadas as concentrações de 500, 300 e 150µg de AnB por mL de veículo, utilizando o mesmo regime posológico. A concentração de 500µg/mL foi excluída do trabalho devido às reações inflamatórias apresentadas pelos animais no local de administração da formulação.

A Figura 12 representa todo o processo de experimentação *in vivo* definido para este trabalho. Seis semanas após o inóculo descrito no subitem 4.9, os animais infectados foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) e tratados durante duas semanas, em dias alternados (6 administrações) com: (1) PBS; (2) solução de F127 a 16% em PBS (F127 a 16%) ; (3) AnB 150µg/mL dispersa em PBS (AnB livre); (4) solução de F127 a 16% contendo AnB 150µg/mL (F127 + AnB 150µg/mL) ; (5) solução de F127 a 16% contendo AnB 300µg/mL (F127 + AnB 300µg/mL). A via subcutânea foi escolhida para a administração dos diferentes tratamentos, considerando-se a rápida absorção das micelas pelo sistema linfático (HATEFI; AMSDEN, 2002) e a facilidade de administração por esta via na região dorsal dos animais. O regime posológico de múltiplas doses foi adotado com a finalidade de verificar a eficácia e a toxicidade das formulações, uma vez que a toxicidade da AnB está relacionada com a dose total administrada durante todo o tratamento (MULLEN; CARTER; BAILLIE, 1997; SCHÖFFSKI *et al.*, 1998). As dosagens de AnB presentes nas formulações foram escolhidas baseadas na eficácia e toxicidade mostradas pelas mesmas na literatura (GANGNEUX *et al.*, 1996).

Figura 12: Delineamento experimental referente à avaliação da atividade leishmanicida e análise bioquímica das amostras retiradas dos camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* após os diversos tratamentos.

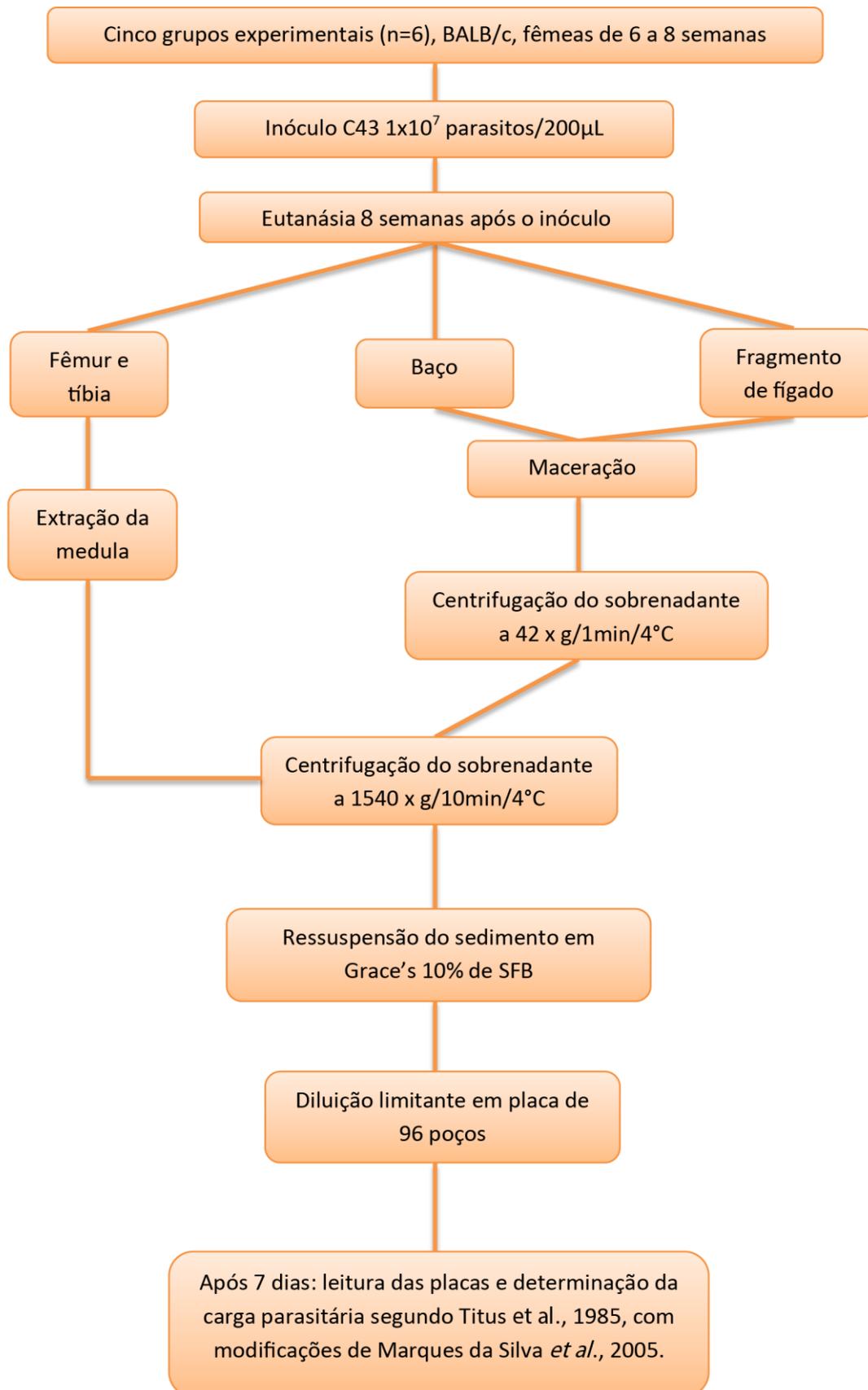


4.11 Avaliação da atividade leishmanicida das formulações de anfotericina B

Ao 14º dia após o início do tratamento, os animais foram eutanasiados por overdose de uma combinação de anestésicos administrada pela via intraperitoneal (cloridrato de cetamina 10% a 24,0mg/Kg e cloridrato de xilazina 2,3% a 12,0mg/Kg) e procedeu-se a quantificação da carga parasitária no fígado, baço e medula óssea através do método de diluição limitante (TITUS *et al.*, 1985) com modificações (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005). Após a eutanásia, os animais foram umedecidos com álcool etílico 70° (v/v). Sob condições asséptica, os animais, postos em decúbito dorsal, tiveram sua cavidade abdominal aberta com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica. O sangue de cada animal foi coletado por punção cardíaca para posterior análise bioquímica. O fígado, o baço e uma das patas traseiras foram coletados de cada animal. Para fim de análises morfológicas, o rim direito de cada animal também foi removido e devidamente conservado. Um fragmento do fígado de cada animal foi removido para utilização na quantificação de parasitos. Os fragmentos do fígado e os baços tiveram suas massas determinadas e permaneceram em banho de gelo imersos em meio de lavagem pH=7,2 constituído por DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina e 100 U/mL de penicilina G. A porção restante do fígado teve sua massa total determinada. Os fragmentos de fígado e os baços foram então macerados individualmente, com o auxílio de um macerador de órgãos (Pyrex® 2mL *TenBroeck homogenizer with pour spout*) e o sobrenadante da maceração coletado em tubo cônico de 15mL. O volume total da maceração do fragmento de fígado e um quinto do volume obtido pela maceração do baço foram submetidos à centrifugação 42 x *g*/ 1 min 4°C. Para a determinação da carga parasitária na medula óssea, retirou-se o fêmur e a tíbia da pata traseira esquerda de cada animal e imergiu-se os ossos em álcool etílico 70° (v/v) por 2 min, seguido por imersão em meio de lavagem. As epífises dos ossos foram cortadas com auxílio de um bisturi e meio de lavagem foi injetado pelas extremidades, até completa remoção da medula. Os materiais resultantes do processamento do baço, fragmentos de fígado e medula óssea foram centrifugados (1540 x *g*/ 10 min 4°C) e o precipitado assim formado foi

ressuspenso em 500µL de meio *Grace's* 10% de SFB. Plaqueou-se o material assim obtido, em duplicata, em placas de 96 poços de fundo chato, estéreis, seguindo diluições sucessivas 1:5 (v/v) em meio *Grace's* 10% de SFB. A quantificação dos parasitos foi determinada em 7 dias, observando-se o crescimento dos parasitos ao longo da diluição (1:5 v/v). Considerou-se como 3 parasitos/mg de tecido, a quantificação no primeiro poço da diluição. A Figura 13 é uma representação esquemática deste experimento.

Figura 13: Diagrama referente ao experimento de quantificação de parasitos para avaliação da atividade leishmanicida das formulações de F127.



4.12 Avaliação da toxicidade das formulações no tratamento de camundongos não infectados.

Para avaliação da toxicidade das formulações, foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c não infectadas saudáveis com idade equivalente à dos animais do grupo infectado e procedeu-se o mesmo tratamento dos respectivos grupos (n=4), com as mesmas formulações e regime posológico citados no subitem 4.10. Ao fim do tratamento, procedeu-se a eutanásia por overdose de anestésicos e coletou-se o sangue por punção cardíaca para análises bioquímicas.

4.13 Análises bioquímicas

Após a retração do coágulo, o sangue coletado no subitem 4.11 foi processado em centrífuga para microtubo a 164 x g durante 15 min. Separou-se o soro e procedeu-se o congelamento a -80°C para posterior análise bioquímica. Foram realizados testes para avaliação da função renal - creatinina e ureia - e função hepática - aspartato cetoglutarato aminotransferase (AST) e alanina cetoglutarato aminotransferase (ALT).

Os testes foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Roney Luiz de Carvalho Nicolato, responsável técnico pelo Laboratório Piloto de Análises Clínicas – LAPAC/UFOP. As amostras foram processadas no analisador automático Metrolab 2300 – Wiener (*Fully Automatic Random Access Clinical Analyzer*) devidamente ajustado com os calibradores e controles específicos para os kits diagnósticos Bioclin-Quibasa.

4.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o auxílio do software *GraphPad Prism 5*. Inicialmente, todas as amostras foram submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino & Pearson. As amostras que apresentaram distribuição normal foram analisadas por ANOVA *one way*, seguidas de teste de Tukey. Variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas pela equação $y = \log(\text{variável} + 10)$. Os dados que mesmo após a transformação matemática não apresentaram

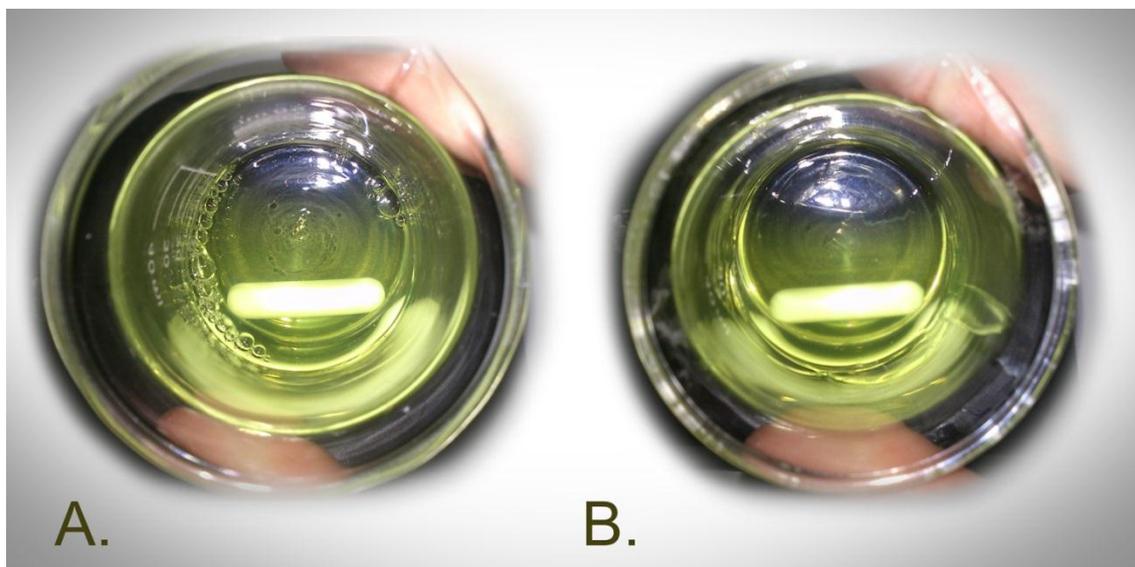
distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento das formulações de F127 contendo anfotericina B.

Para os experimentos in vivo, formulações de F127 contendo AnB foram desenvolvidas utilizando o método de dispersão a frio descrito no subitem 4.2. A solução de F127 apresentou-se límpida e transparente, passando a ter coloração amarelada após a adição da AnB, como ilustra a Figura 14. Na temperatura de 37°C, as soluções transformaram-se em géis semirrígidos mesmo após a incorporação da AnB.

Figura 14: Aspecto físico das formulações de F127 e anfotericina B. **Legenda:** A – Formulação de F127 a 16% p/p + AnB 150µg/mL. B - Formulação de F127 a 16% p/p + AnB 300µg/mL.



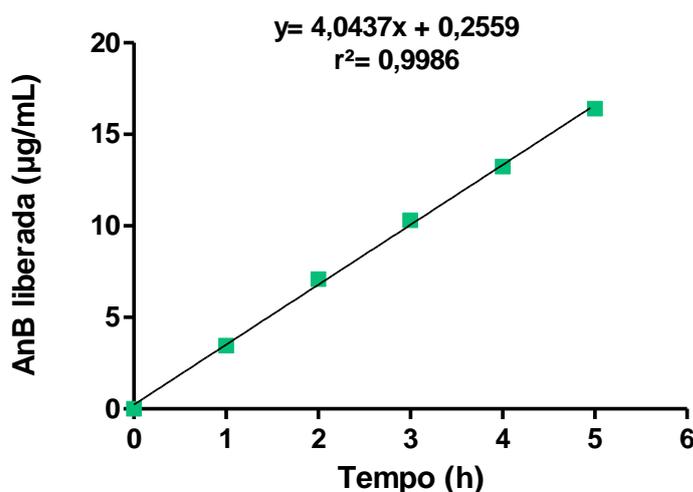
Segundo Torrado e colaboradores (2008), diferenças de opacidade entre formulações contendo diferentes concentrações de AnB podem ocorrer devido

à presença de uma maior concentração de oligômeros e/ou agregados de oligômeros em proporção à forma monomérica da molécula. Os autores também ressaltam que a forma mais ativa da AnB é a forma monomérica e que quanto maior a concentração destes monômeros na formulação, maior poderá ser a eficácia da formulação em um tratamento *in vivo* (TORRADO *et al.*, 2008).

5.2 Estudo de liberação da anfotericina B a partir da formulação de F127 a 16% no estado gel *in vitro*.

A Figura 15 representa a quantidade AnB liberada da formulação de F127 a 16% acumulada ao longo de 5 horas de experimento. O coeficiente de correlação obtido foi da ordem de 0,9988. Como pode ser observado, foram liberados 16,41µg de AnB durante o tempo do experimento. A formulação liberou $3,28 \pm 0,27\mu\text{g}$ de AnB por mL de tampão por hora, demonstrando que a AnB foi liberada da formulação de um modo controlado.

Figura 15: Perfil de liberação da anfotericina B da formulação de F127 a 16% no estado gel.



As formulações de F127 são constituídas de grande número de micelas e canais aquosos, através dos quais o fármaco incorporado pode ser liberado de duas maneiras: difusão através dos canalículos aquosos e/ou erosão e dissolução da estrutura da matriz que constitui o gel (BHARDWAJ; BLANCHARD, 1996). O micro ambiente criado como consequência das interações entre cadeias de polioxietileno de micelas adjacentes (ATTWOOD; COLLETT; TAIT, 1985) – formando unidades multimoleculares das micelas – parece conseguir acomodar a complexidade estrutural da molécula de AnB. A característica anfifílica da AnB é devido as diversas ligações de grupos hidroxila em uma dos lados da estrutura (hidrofilicidade) e pela extensa cadeia carbônica com duplas ligações conjugadas não substituídas (hidrofobicidade) do outro lado da molécula (ASHER; SCHURARTZMAN, 1977). Especula-se que após a acomodação da AnB, o diâmetro dos microporos e dos canalículos podem ter se tornado mais estreitos e tortuosos, dificultando a penetração do meio de reidratação e retardando, desta forma, a liberação da AnB através dos canalículos e microporos, ou mesmo, a dissolução e a erosão da matriz do gel (GILBERT *et al.*, 1986; BHARDWAJ; BLANCHARD, 1996).

5.3 Análise do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das micelas/partículas das formulações de F127 contendo anfotericina B

Na Tabela 4 estão representados os diâmetros médios, o índice de polidispersão e o potencial zeta das micelas/partículas presentes nas formulações de F127.

Tabela 4: Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das micelas/partículas presentes nas formulações de F127 e anfotericina B. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta
F127 + AnB 150 $\mu\text{g/mL}$	127,3 \pm 18,5	0,313 \pm 0,096	-11,4 \pm 3,05
F127 + AnB 300 $\mu\text{g/mL}$	139,0 \pm 27,0	0,365 \pm 0,077	-15,4 \pm 1,04

É possível observar na Tabela 4 que o diâmetro médio das micelas/partículas da formulação F127 contendo AnB nas concentrações de 150 e 300 µg/mL foram $127,3 \pm 18,5$ e $139,0 \pm 27,0$, respectivamente. De acordo com Romero e Morilla (2008), o tamanho médio das micelas/partículas das formulações de F127 contendo AnB em diferentes concentrações podem ser consideradas de tamanho intermediário (100 – 150nm). Desta forma, acredita-se que as soluções de F127 contendo AnB, quando administradas por via subcutânea *in vivo*, formem um gel semirrígido ao contato com o tecido do local da aplicação, criando um sistema reservatório e fazendo com que a AnB permaneça no espaço extracelular. À medida que a matriz do gel formado vai sendo diluída pelo fluido corporal, micelas/partículas de diâmetros manométricos contendo a AnB são liberadas para a circulação sistêmica (BARICHELLO *et al.*, 1999).

O índice de polidispersão (IP) fornece informações sobre a homogeneidade da população de micelas/partículas presentes na formulação em relação ao diâmetro das mesmas. Os valores encontrados para ambas as formulações de F127 foram maiores que 0,3. Isso quer dizer que as formulações contendo ambas as concentrações de AnB apresentam-se como um sistema ligeiramente polidisperso. O que poderia explicar esse tipo de distribuição e o fato de que, em solução e em função da concentração do fármaco, poderá ocorrer a presença de mais de uma espécie de AnB na mesma formulação, conseqüentemente ocasionando uma variação no tamanho das micelas/partículas (TORRADO *et al.*, 2008). Dados da literatura indicam também que altas concentrações de F127 nas soluções podem causar aumento no tamanho das micelas e elevação do IP das mesmas, sendo que tais modificações são conseqüências da formação das unidades multimoleculares, já citadas anteriormente (ATTWOOD; COLLETT; TAIT, 1985).

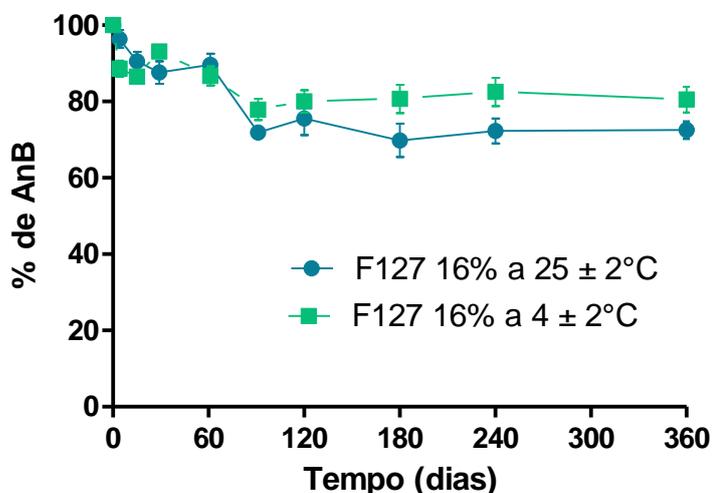
O potencial zeta representa a carga de superfície das micelas/partículas. Ao mesmo tempo, é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade. Sua medição oferece uma visão detalhada sobre as causas da dispersão,

agregação ou floculação, podendo ser aplicada para melhorar a formulação de dispersões, emulsões e suspensões. Esta variável é influenciada pelas mudanças na interface entre o sistema particulado e o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície das partículas ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O copolímero F127 é um tensoativo não iônico formado pelo óxido de etileno (OE) nas extremidades e óxido de propileno (OP) na parte central (Fig. 6). Desta forma, sua organização em micelas na presença de ambas as concentrações de AnB parece ter produzido uma superfície sem grupos ionizáveis, onde a carga levemente negativa remanescente é dada pela camada mais externa formada pelos grupos de óxido de etileno expostos.

5.4 Estudo de estabilidade da formulação de F127 a 16% + anfotericina B nos estados sol e gel.

O perfil de estabilidade da formulação de F127 a 16% + AnB nos estados sol e gel está representado na Figura 16. É possível observar que aproximadamente 80% da concentração da AnB inicial permaneceu intacta na formulação após o período de 360 dias em que a formulação foi avaliada.

Figura 16: Estabilidade da anfotericina B na formulação de F127 a 16% no estado sol e gel.



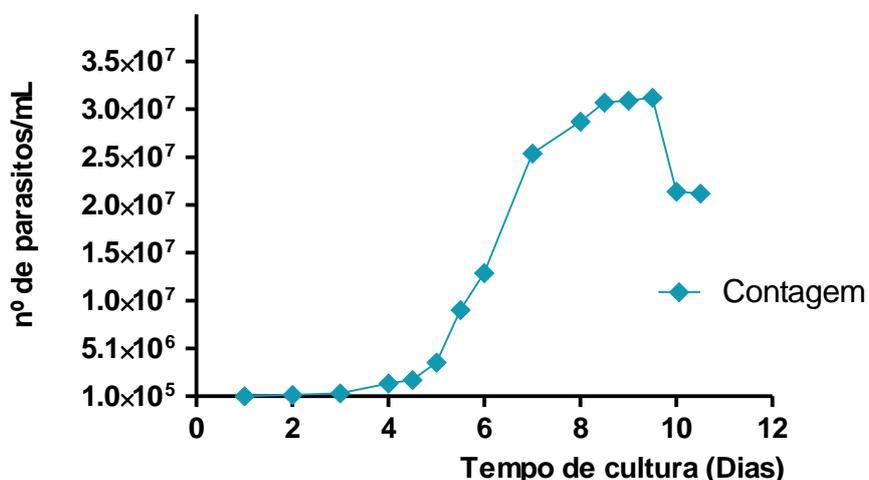
Uma característica importante dos géis de F127 é dar estabilidade a proteínas e peptídeos incorporados em suas matrizes, com completa recuperação de sua atividade quando o gel é dissolvido em excesso de solução tampão (STRATTON *et al.*, 1997). Os resultados aqui apresentados demonstram que tanto no estado sol quanto no estado gel, a formulação de F127 a 16% foi capaz de promover a estabilidade de AnB. Pode-se dizer que o microambiente criado pelas interações entre cadeias de polioxietileno de micelas adjacentes (ATTWOOD; COLLETT; TAIT, 1985) parece proteger o fármaco da degradação pela luz e da hidrólise nas condições estudadas.

No conjunto, os resultados obtidos são importantes visto a dificuldade de se obter uma formulação estável de AnB, uma vez que este fármaco apresenta não apenas fotossensibilidade, como também baixa solubilidade na grande maioria dos solventes orgânicos e inorgânicos.

5.5 Curva de crescimento da cepa C43 de *Leishmania infantum*

A curva de crescimento da cepa C43 de *L. infantum* está representada na Figura 17. Nela pode-se observar que a fase estacionária iniciou-se entre o sétimo e o oitavo dia para os parasitos da cepa C43 nas condições experimentais utilizadas.

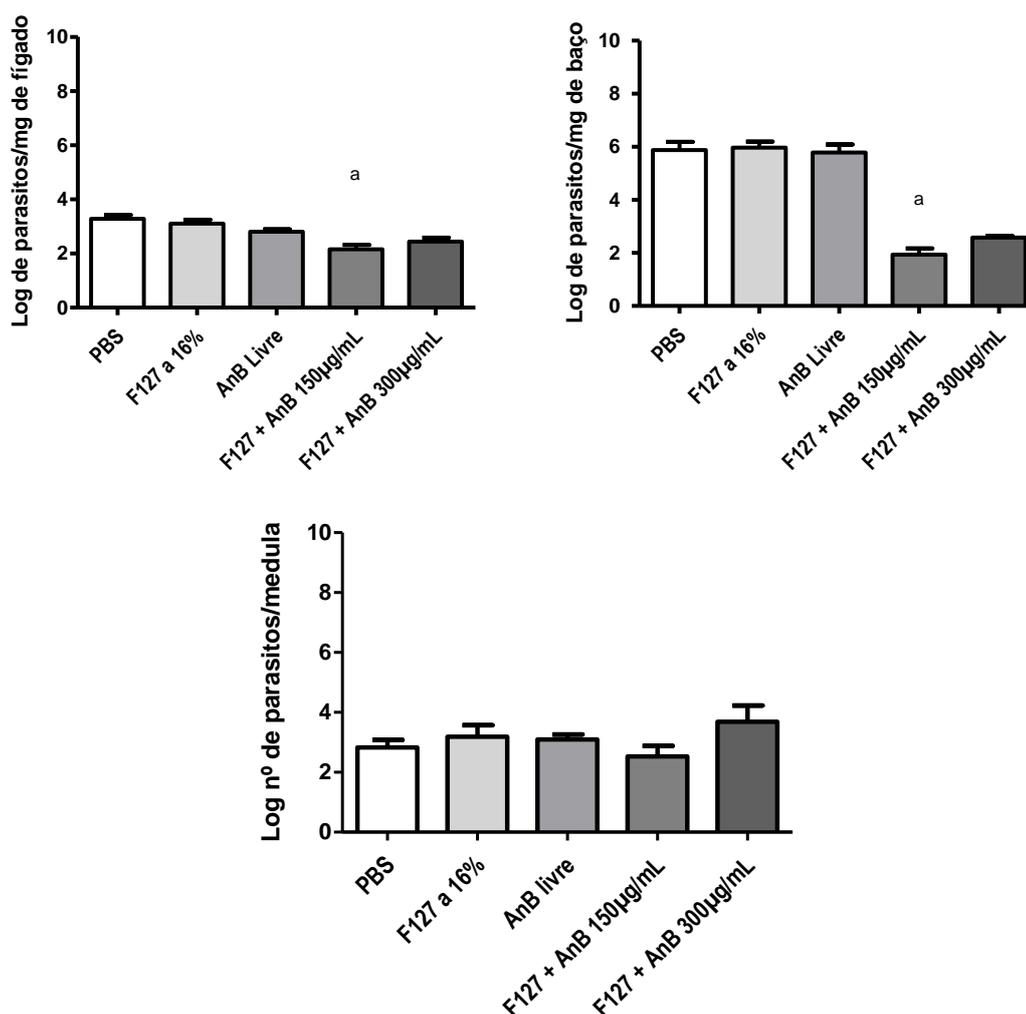
Figura 17: Curva de crescimento *in vitro* da cepa C43 de *Leishmania infantum* em meio Grace's 10% de Soro Fetal Bovino a 23°C.



5.6 Avaliação da atividade leishmanicida após tratamento com diferentes formulações

Na Figura 18, está representada a avaliação da carga parasitária nos órgãos alvo da leishmaniose de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* após o tratamento com formulações contendo AnB livre ou em soluções de F127 administradas pela via subcutânea.

Figura 18: Carga parasitária no fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* após diferentes tratamentos. **Legenda:** PBS – tampão fosfato pH= 7,4; F127 a 16% - solução de Pluronic® F-127 a 16% em PBS; AnB livre – AnB 150µg/mL dispersa em PBS; F127 + AnB 150µg/mL – F127 a 16% + AnB 150µg/mL; F127 + AnB 300µg/mL - F127 a 16% + AnB 300µg/mL. Carga parasitária no fígado e baço expressa em log de parasitos/mg de tecido e na medula em log de parasitos/órgão. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) relação ao grupo PBS (a).



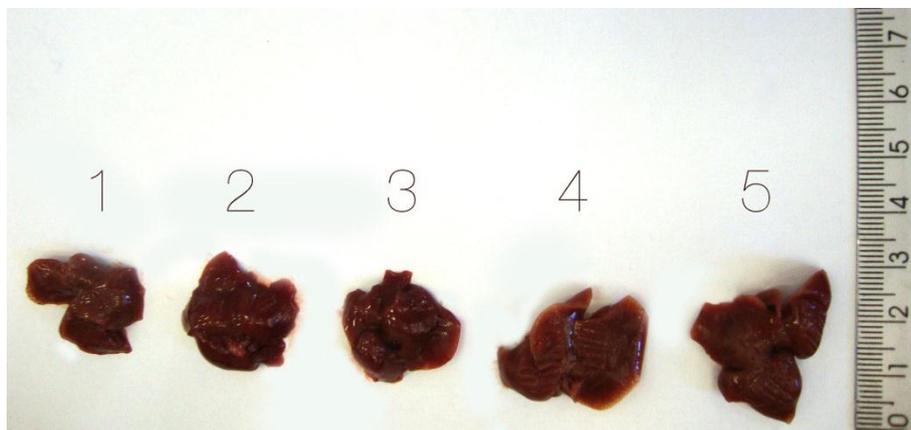
Os resultados apresentados demonstram uma redução estatisticamente significativa na carga parasitária no fígado e no baço dos animais tratados com F127 + AnB 150µg/mL comparado ao grupo controle, mostrando que a AnB alcança tais órgãos e age contra os parasitos. Como relatado no item 2.2, sem o polímero F127, a forma agregada da AnB começa a se formar no meio aquoso na concentração de 0,2µg/mL. Assim, pode-se inferir que a solução de F127 é capaz de estabilizar em meio aquoso uma concentração muito maior de AnB na forma monomérica, uma vez que o grupo tratado com a solução de AnB + F127 na concentração de 150µg/mL apresentou redução na carga parasitária.

A redução da carga parasitária no baço é um resultado muito interessante, uma vez que este órgão permanece como sítio de infecção crônica por toda a vida do animal, podendo ser foco de estudos futuros do grupo de pesquisa. Pode-se observar também que a AnB livre, na mesma dose, não teve efeito sobre a carga parasitária dos mesmos órgãos. Isso pode ter ocorrido devido à instabilidade da AnB em meio aquoso, o que pode ter favorecido sua degradação, explicando a baixa atividade. O tratamento com F127 + AnB 300µg/mL não exerceu redução significativa na carga parasitária do fígado e baço. A alta concentração de AnB nessa formulação pode ter favorecido a formação de oligômeros, o que explicaria a baixa atividade da mesma. Não foi observada redução significativa da carga parasitária na medula óssea dos animais submetidos a nenhum dos tratamentos.

5.7 Características morfológicas do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* após diferentes tratamentos

A Figura 19 apresenta uma fotografia do fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* após diferentes tratamentos. Nela é possível observar que o fígado dos animais que foram tratados com F127 a 16%, F127 + AnB 150µg/mL e F127 + AnB 300µg/mL apresentaram tamanho maior que o fígado dos animais não tratados (PBS).

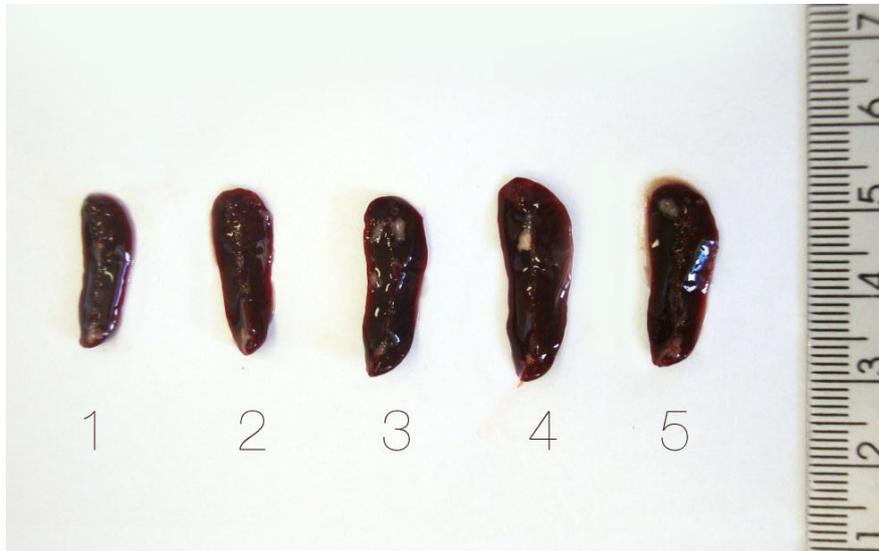
Figura 19: Fotografia representativa do fígado de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* após diferentes tratamentos. **Legenda:** 1 – PBS; 2 – F127 a 16%; 3 – AnB livre 150µg/mL; 4 – F127 + AnB 150µg/mL; 5 – F127 + AnB 300µg/mL.



Os resultados da análise estatística mostram que o aumento do peso médio do fígado foi significativo para os animais tratados com F127, F127 + AnB 150µg/mL e F127 + AnB 300µg/mL em comparação ao peso médio do fígado dos animais controle, sugerindo que o aumento de peso do fígado está relacionado à administração de F127. O aumento do fígado dos animais tratados com F127 + AnB 300µg/mL foi significativo também quando comparado ao grupo de animais tratado com AnB livre.

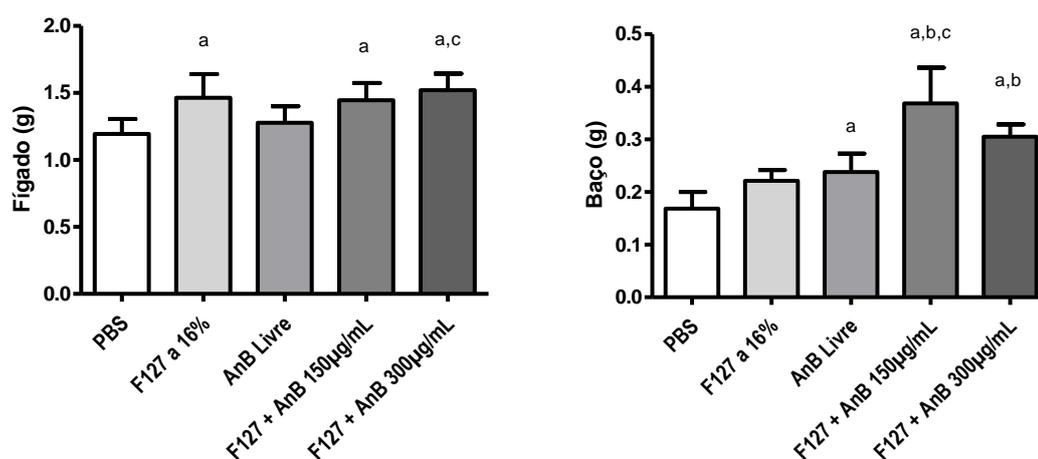
A Figura 20 apresenta uma fotografia do baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* após diferentes tratamentos. Nela é possível observar que o baço dos animais que receberam os tratamentos AnB livre, F127 + AnB 150µg/mL e F127 + AnB 300µg/mL apresentaram tamanho maior do que o baço dos animais não tratados (PBS).

Figura 20: Fotografia representativa do baço de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* após diferentes tratamentos. **Legenda:** 1 – PBS; 2 – F127 a 16%; 3 – AnB livre 150µg/mL; 4 – F127 + AnB 150µg/mL; 5 – F127 + AnB 300µg/mL.



De acordo com a análise estatística, a diferença do peso médio do baço foi significativa para os animais tratados com formulações contendo AnB (AnB livre, F127 + AnB 150µg/mL e F127 + 300µg/mL) em comparação ao peso médio do baço dos animais do grupo controle. A diferença estatística também ocorreu quando os pesos dos baços dos animais tratados com F127 + AnB 150µg/mL e F127 + 300µg/mL foram comparados ao peso médio dos baços dos animais tratados com F127, demonstrando que o aumento de peso médio no baço está relacionado à administração de formulações contendo AnB. A Figura 21 mostra o perfil estatístico apresentado pelos pesos médios dos órgãos dos animais infectados com *L. infantum* e submetidos aos diferentes tratamentos.

Figura 21: Peso médio do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* após diferentes tratamentos. **Legenda:** PBS – tampão fosfato pH= 7,4; F127 a 16% - solução de Pluronic® F-127 a 16% em PBS; AnB livre – AnB 150µg/mL em PBS; F127 + AnB 150µg/mL – F127 a 16% + AnB 150µg/mL; F127 + AnB 300µg/mL – F127 a 16% + AnB 300 µg/mL. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação a: a – PBS, b – F127 a 16% e c – AnB livre.



Para avaliar o que acontece nos tecidos para que haja este aumento considerável no tamanho dos órgãos, seria necessária uma avaliação histopatológica dos mesmos. O processamento do fígado foi realizado para que esta análise fosse feita, mas devido às restrições nos aparelhos necessários para tal e à expiração do prazo para conclusão deste trabalho, a mesma não pôde ser concluída a tempo. Porém, o que pode-se sugerir é um aumento na atividade do órgão, bem como no recrutamento de células de defesa, uma vez que os resultados das avaliações bioquímicas demonstram que não houve danos detectáveis por este método no fígado (vide item 5.8).

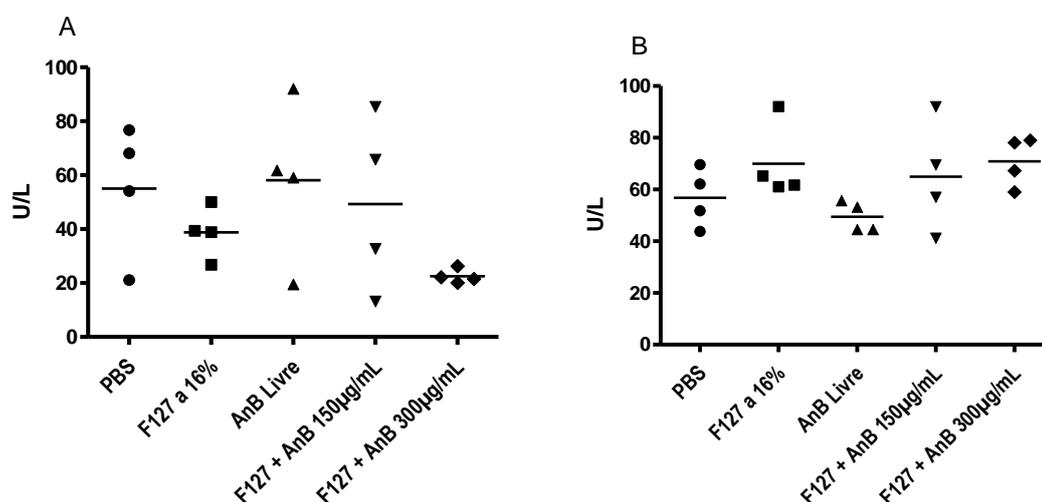
Não foi observada nenhuma alteração na morfologia dos rins retirados dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

5.8 Avaliação da função hepática em camundongos BALB/c sadios e infectados com *Leishmania infantum* após diferentes tratamentos.

A função hepática é normalmente avaliada pela concentração sérica de bilirrubinas, proteínas, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e aminotransferases (KANAAN *et al.*, 2008). Neste trabalho esta avaliação foi realizada apenas através da quantificação dos níveis séricos das aminotransferases (TGO, TGP) devido ao pequeno volume de material biológico obtido para análise (cerca de 200 μ L).

A Figura 22 representa os valores obtidos na avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c sadios após os diferentes tratamentos.

Figura 22: Avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c sadios após diferentes tratamentos. **Legenda:** A - asparto cetoglutarato aminotransferase (AST) e B - alaninacetoglutarato aminotransferase (ALT). PBS - tampão fosfato pH= 7,4; F127 a 16% - solução de Pluronic® F-127 a 16% em PBS; AnB livre – AnB 150 μ g/mL em PBS ; F127 + AnB 150 μ g/mL – F127 a 16% + AnB 150 μ g/mL; F127 + AnB 300 μ g/mL – F127 a 16% + AnB 300 μ g/mL. Os resultados estão expressos em unidades por litro (U/L).

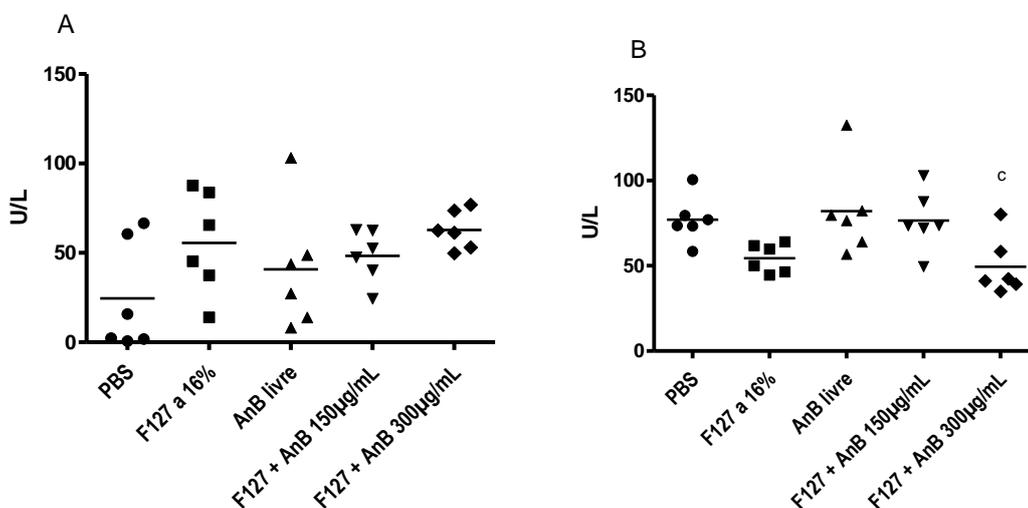


Os resultados demonstraram que os níveis séricos de AST e ALT não foram estatisticamente diferentes em comparação aos valores do grupo tratado com solução salina (controle), indicando que a administração destas

formulações não foi capaz de induzir alterações significativas nos parâmetros bioquímicos indicadores de toxicidade hepática.

Na Figura 23 está representada a avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* após diferentes tratamentos. Sabe-se que a leishmaniose visceral afeta diretamente órgãos ricos em células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), como baço, fígado, medula óssea e linfonodos (HERWALDT, 1999; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Dados da literatura mostram também que a evolução da leishmaniose visceral leva a um importante comprometimento do fígado, desencadeando alterações na sua arquitetura e subsequente comprometimento de suas funções (GUTIERREZ; MAKSEM; REINER, 1984; GIUNCHETTI *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2009).

Figura 23: Avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* após diferentes tratamentos. **Legenda:** (A) asparto cetogluturato aminotransferase (AST) e (B) alaninacetogluturato aminotransferase (ALT) expressas em U/L; PBS – tampão fosfato pH= 7,4; F127 a 16% - solução de Pluronic® F-127 a 16% em PBS; AnB livre – AnB 150µg/mL em PBS; F127 + AnB 150µg/mL – F127 a 16% + AnB 150µg/mL; F127 + AnB 300µg/mL – F127 a 16% + AnB 150µg/mL. Os dados representam a média ± desvio padrão dos animais de cada grupo (n= 6). Diferença estatisticamente significativa ente os níveis de ALT do grupo F127 + AnB 300µg/mL comparado ao grupo AnB livre (c).



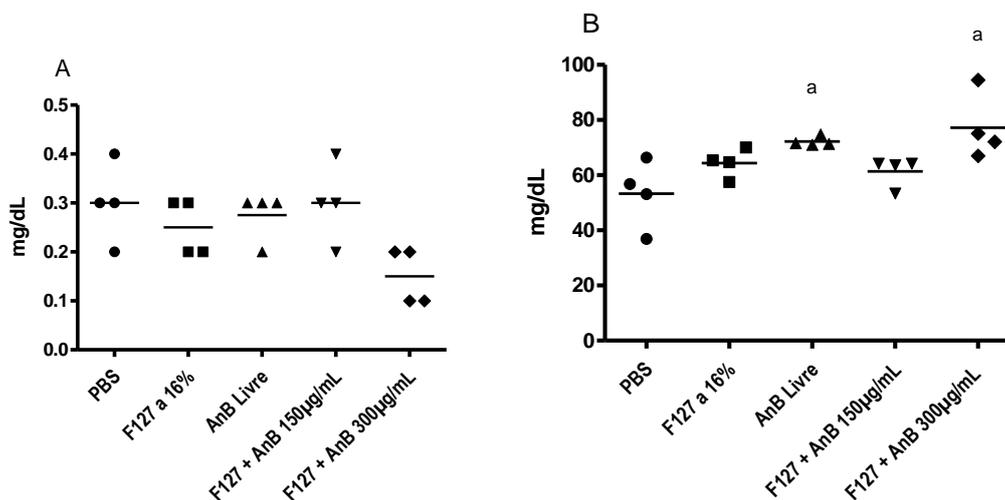
Os resultados demonstram que não houve alteração significativa do nível de AST de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* entre os diferentes tratamentos. Também não houve alteração estatisticamente significativa quando os valores de AST dos grupos tratados foram comparados com os valores obtidos de animais saudáveis, podendo significar que o órgão permaneceu íntegro após o tratamento. No entanto, uma redução significativa dos níveis de ALT foi observada nos camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e tratados com F127 + AnB 300µg/mL em relação aos níveis dos animais tratados com AnB livre, podendo sugerir uma hepatoproteção realizada pelo polímero em relação à toxicidade da AnB.

5.9 Avaliação da função renal em camundongos BALB/c saudáveis e infectados com *Leishmania infantum* após diferentes tratamentos.

O monitoramento da função renal é uma preocupação importante no tratamento da leishmaniose com a AnB, visto que os principais efeitos adversos do medicamento estão relacionados a algum aspecto de disfunção renal. Na Figura 24, estão representadas as concentrações séricas de creatinina e ureia de camundongos BALB/c saudáveis após diferentes tratamentos.

A creatinina e a uréia são dois marcadores séricos importantes indicadores do comprometimento da função renal. A creatinina é um produto residual da creatina. A transformação de creatina em creatinina acontece no tecido muscular, no qual 1-2% da creatina livre se converte espontaneamente e irreversivelmente em creatinina todos os dias. Logo, a quantidade de creatinina produzida é dependente da massa muscular e não apresenta grandes variações diárias. A creatinina é filtrada livremente no glomérulo e sua dosagem no sangue e na urina é um importante marcador da função renal. A ureia é o principal produto do metabolismo de proteínas e é excretada quase em sua totalidade pelos rins e a elevação da mesma no sangue pode ser um indicador de insuficiência renal.

Figura 24: Avaliação bioquímica da função renal de camundongos BALB/c sadios após diferentes tratamentos. **Legenda:** Creatinina (A) e ureia (B) expressas em mg/dL. PBS – tampão fosfato pH= 7,4; F127 a 16% - solução de Pluronic® F-127 a 16% em PBS; AnB livre – AnB 150µg/mL em PBS; F127 + AnB 150µg/mL – F127 a 16% + AnB 150µg/mL; F127 + AnB 300µg/mL – F127 a 16% + AnB 300µg/mL. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação a PBS (a).



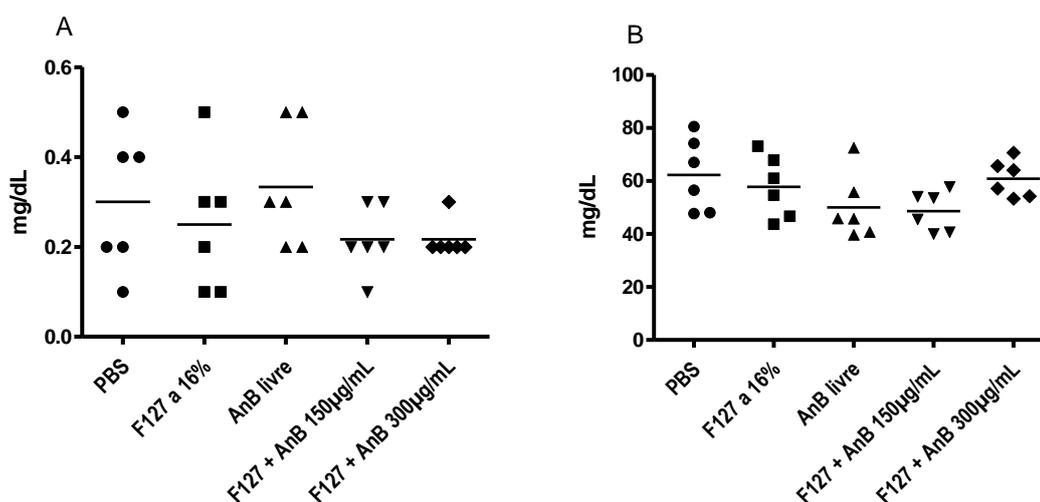
O tratamento com AnB quase sempre resulta em algum grau de disfunção renal que varia de um paciente para outro. Em diversos estudos foi observado que durante o período de tratamento com AnB, as concentrações séricas de creatinina elevavam-se (SCHÖFFSKI *et al.*, 1998; WALSH *et al.*, 1999; MORA-DUARTE *et al.*, 2002), muitas vezes até três vezes o limite superior da normalidade (WALSH *et al.*, 1999). Um estudo em células renais de ratos conduzido por Varlam e colaboradores (2001) sugeriu que a AnB induzia apoptose em células tubulares renais e em células intersticiais em taxa diretamente proporcional à concentração. Outros estudos demonstraram que o efeito tóxico foi máximo nos túbulos (hipocalemia, hipostenúria, diminuição da capacidade de excretar ácidos), mas também envolveu os glomérulos (diminuição da depuração de creatinina e azotemia) (BURGESS; BIRCHALL, 1972; BHATHENA *et al.*, 1978; GERKENS; BRANCH, 1980; HEIDEMANN *et al.*, 1983; SABRA *et al.*, 1990).

Através da análise estatística, foi possível observar que os resultados não apresentaram diferença significativa entre os grupos nos níveis de creatinina. Por outro lado, a elevação nos valores séricos de ureia obtidos de

camundongos sadios após o tratamento com AnB livre e F127 + AnB 300µg/mL foi estatisticamente significativa em comparação ao valores obtidos no grupo tratado com solução salina (controle). Isso pode significar que o polímero F127 na concentração de 16% não é capaz de estabilizar totalmente na forma monomérica essa grande quantidade de AnB, permitindo que agregados que causam a nefrotoxicidade sejam formados nessa concentração, assim como os que existem na solução aquosa (AnB livre). Foi possível observar também que tal fato não ocorreu no grupo de animais tratados com F127 + AnB 150µg/mL, sugerindo que nesta concentração, a solução de F127 é capaz de impedir a formação dos agregados.

Na Figura 25 estão representados os valores de creatinina e ureia de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* após diferentes tratamentos.

Figura 25: Avaliação bioquímica da função renal de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* após diferentes tratamentos. **Legenda:** (A) Concentração sérica de creatinina expressa em mg/dL. (B) Concentração sérica de ureia expressa em mg/dL. PBS - tampão fosfato pH= 7,4; F127 a 16% - solução de Pluronic® F-127 a 16% em PBS; AnB livre – AnB 150µg/mL em PBS ; F127 + AnB 150µg/mL – F127 a 16% + AnB 150µg/mL; F127 + AnB 300µg/mL – F127 a 16% + AnB 300µg/mL.



Os resultados demonstram que após os diferentes tratamentos, não ocorreram alterações significativas nos valores de creatinina e ureia, indicando que os rins não são descritos na

literatura como focos de parasitismo das espécies de *Leishmania*. Comparando-se os valores da dosagem de creatinina e ureia do grupo PBS com os valores de referência obtidos de animais sadios, pode-se dizer também que a infecção por *L. infantum* aparentemente não interferiu no funcionamento do sistema renal dos animais.

6 CONCLUSÃO

Os resultados dos experimentos de caracterização *in vitro* das formulações demonstraram que a matriz do gel de F127 foi capaz de controlar e reduzir a liberação da AnB para o meio de dissolução. Também foi observado que as formulações de F127 no estado sol (4°C) e gel (25°C) foram capazes de minimizar o processo de degradação da molécula de AnB, mantendo cerca de 80% do fármaco presente na formulação estável por um período de 360 dias.

Os experimentos *in vivo* demonstraram que a formulação de F127 contendo 150µg/mL de AnB reduziu significativamente a carga parasitária no fígado e no baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, mas não na medula óssea. Além disso, a mesma formulação não provocou efeitos de nefro e hepatotoxicidade nos grupos experimentais sadios e infectados com *L. infantum*.

Pode-se dizer também que a concentração de AnB interfere na atividade leishmanicida, muito provavelmente devido à presença de estados de agregação molecular diferentes da forma monomérica, o que foi refletido no experimento de quantificação de parasitos, onde pode-se observar uma atividade mais eficaz da formulação contendo 150µg/mL de AnB sobre a formulação contendo maior concentração, 300µg/mL.

Desta forma, os resultados deste trabalho sugerem que as soluções de F127 a 16% contendo AnB administradas por via subcutânea representam uma alternativa terapêutica promissora na redução da carga parasitária em diferentes órgãos alvo da leishmaniose visceral. Com a possibilidade do uso de vias de administração menos invasivas que a endovenosa e redução dos efeitos colaterais, o presente trabalho lança uma luz sobre novas alternativas no tratamento da leishmaniose visceral.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*, v. 7, p. 5, 2012.

ASHER, I.M.; SCHURARTZMAN, G. Amphotericin B. Analytical Profiles Drug Substances. K. (Ed.). Ac. Press, New York. v. 6, p. 1-42, 1977.

ATTWOOD, D; COLLETT, J.; TAIT, C. The micelar properties of the poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) copolymer Pluronic® F127 in water and electrolyte solution. *Int. J. Pharm.*, v.26, n. 1-2, p. 25-33, 1985.

AWASTHI, A., MATHUR, R. K., SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.* v.119, p, 238-258, 2004.

BALANÑA-FOUCE, R., REGUERA, R. M., CUBRÍA, J. C., ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharm.*, v.30, n. 4, p.435-43, 1998.

BARICHELLO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Absorption of insulin from Pluronic F127 gels following subcutaneous administration in rats. *Int. J. Pharm*, v.184(2), p.189-198, 1999a.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR.,G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON JR., W. D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44(5), pp.536-546, 1991.

BARTON, C.H.; PAHL, M.; VAZIRI, N.D. Renal magnesium wasting associated with amphotericin B therapy. *Am. J. Med.*, v. 77, p. 471-474, 1984.

BENNETT, J. Antimicrobial agents: Antifungal agents. In: Hardman J, Limbird L, editors. *The Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill. pp 1175–1790, 1995.

BHARDWAJ, R.; BLANCHARD, J. Controlled-release delivery system for the a-MSH analog melanotan-I using Poloxamer 407. *J. Pharm. Sci.*, v. 85, n. 9, p.915–919, 1996.

BHATHENA, D.B.; BULLOCK, W.E.; NUTTALL, C.E.; LUKE, R.G. The effects of amphotericin B therapy on the intrarenal vasculature and renal tubules in man. *Clin. Neph.*, v. 9, p. 103-110, 1978.

BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. *J. Lipos. Res.*, v. 3, n. 3. p. 409-427, 1993.

BURGESS, J.L.; BIRCHALL, R. Nephrotoxicity of amphotericin B, with emphasis on changes in tubular function. *Am. J. Med.*, v. 53, p. 77-84, 1972.

CARRIÓN, J., NIETO, A., IBORRA, S., INIESTA, V., SOTO, M., FOLGUEIRA, C., ABANADES, D. R., REQUENA, J. M., ALONSO. Immunohistological features of leishmaniasis in BALB/c mice. *Paras. Immun.*, v. 28, p. 173-183, 2006.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R. W., ALVAR, J., BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microb.*, v. 5, n.11, p. 873-82, 2007.

CHATTOPADHYAY, A., JAFURULLA, M.D. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* v. 416, p. 7–12, 2011.

CHOI, H-G.; OH, Y-K.; KIM, C-K. In situ gelling and mucoadhesive liquid suppository containing acetaminophen: enhanced bioavailability. *Int. J. Pharm.*, v.165, n. 1, p.23-32, 1998.

CRAVEN, P.C.; GREMILLION, D.H. Risk factors of ventricular fibrillation during rapid amphotericin B infusion. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 27, n. 5., p. 868-871, 1985.

CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health*, v. 6, n. 11, p. 899-905, 2001.

DOUROUMIS, D.; FAHR, A. Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs. John Wiley & Sons, 2012.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of Poloxamero 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm. Res.*, v. 23, n.12, p. 2709-28, 2006.

FILIPPIN F.B.; SOUZA L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Rev. Bras. Ciências farmacêuticas*, v. 42, n. 2, 2006.

GANIS, P.; AUITABILE, G.; MECHLINKI, W.; SCHAFFNER, C.P. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodo-acetyl derivative. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 93, p. 4560-4564, 1971.

GANGNEUX, J-P.; SULAHIAN, A.; GARIN, Y.J-F.; FARINOTTI, R.; DEROUIN, F. Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrob. Ag. Chemoth.*, v. 40, p. 1214-1218, 1996.

GERBAUD, E.; TAMION, F.; GIRAULT, C.; CLABAULT, K.; LEPRETRE, S.; LEROY, J.; BONMARCHAND, G. Persistent acute tubular toxicity after switch from conventional amphotericin B to liposomal amphotericin B (AmBisome). *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, p. 473- 475, 2003.

GERKENS, J.F.; BRANCH, R.A. The influence of sodium status and furosemide on canine acute amphotericin B nephrotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 214, p. 306-311, 1980.

GILBERT, J. C.; HADGRAFT, J.; BYE, A.; BROOKES, L. G. Drug release from Pluronic® F-127 gels. *Int. J. Pharm.*, v. 32, n. 2-3, p.223–228, 1986.

GIUNCHETTI, R. C., MAYRINK, W., CARNEIRO, C. M., CORRÊA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O. A., MARQUES, M. J., TAFURI, W. L., REIS, A. B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v. 84, n. 2, p. 269-77, 2008.

GUTIERREZ, Y., MAKSEM, J. A., REINER, N. E. Pathologic changes in murine leishmaniasis (*Leishmania donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. *Am. J. Pathol.*, v. 114, n. 2, p. 222-30, 1984.

HATEFI, A.; AMSDEN, B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *J. Controlled Release*, v. 80, p. 9-28, 2002.

HEIDEMANN, H.T.H.; GERKENS, J.F.; SPICKARD, W.A.; JACKSON, E.K.; BRANCH, R.A. Amphotericin B nephrotoxicity in humans decreased by salt repletion. *Am. J. Med.*, v. 75, p. 476-81, 1983.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN, X.; TANG, J.; WANG, J. DONG, S.; WANG, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol- containing supported bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophys. J.*, v. 83, p. 3245-3255, 2002.

JUHASZ, J.; LENAERTS, V.; RAYMOND, P.; ONG, H. Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible poloxamer gels. *Biomaterials*, v. 10, n. 4, p. 265-268, 1989.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Controlled Release*, v. 82, n. 2-3, p. 189-212, 2002.

KANAAN, S., TERRA GARCIA, M. A., PERALTA, R. H. S., RIBEIRO, M. L. S., BENJO, A. M., AFFONSO, F. S. *Bioquímica Clínica da Universidade Federal Fluminense – UFF*. São Paulo: Atheneu, 2008.

LEE, B-J.; LEE, T-S.; CHA, B-J.; KIM, S-H; KIM, W-B. Percutaneous absorption and histopathology of a poloxamer-based formulation of capsaicin analog. *Int. J. Pharm.*, v.159, n.1 p.103-114, 1997.

MARQUES-DA-SILVA, E. A., COELHO, E. A., GOMES, D. C., VILELA, M. C., MASIOLI, C. Z., TAVARES, C. A., FERNANDES, A. P., AFFONSO, L. C., REZENDE, S. A. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasit. Res.*, v. 98, p. 67-74, 2005

MELO, F. A., MOURA, E. P., RIBEIRO, R. R., ALVES, C. F., CALIARI, M. V., TAFURI, W. L., CALABRESE, K. S., TAFURI, W. L. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 90, n. 5, p. 538-48, 2009

MILHAUD, J.; PONSINET V.; TAKASHI M.; MICHELS, B. Interactions of the drug amphotericin b with phospholipid membranes containing or not ergosterol: New insights into the role of ergosterol. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1558, p. 95–108, 2002.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A.L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive. *New Eng. J. Med.* V. 347, n. 25. p. 2020-2029, 2002.

MOUGNEAU, E., BIHL, F., GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol. Rev.*, v. 240, n. 1, p.286-96, 2011

MULLEN, A. B.; CARTER, K. C.; BAILLIE, A. J. Comparison of the Efficacies of Various Formulations of Amphotericin B against Murine Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 41, p. 2089–2092, 1997.

NIETO, A., DOMÍNGUES-BERNAL, G., ORDER, J. A., DE LA FUENTE, R., MADRID-ELENA, N., CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet. Res.*, v. 42, n.39, 2011.

NUCCI, M.; LOUREIRO, M.; SILVEIRA, F.; CASALL, A.R.; BOUZAS, L.F.; VELASCO, E.; SPECTOR, N.; PULCHERI, W. Comparison of the toxicity of amphotericin B in 5% dextrose with that of amphotericin B in fat emulsion in a randomized trial with cancer patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, p. 1445-1448, 1999.

PLUMB, D. C. Veterinary drug handbook. 3rd edition. John Wiley & sons. 1999.

RACIS, S.P; PLESCIA, O.J.; GELLER, H.M.; SCHAFFNER, C.P. Comparative toxicities of amphotericin B and its monomethyl ester derivative on glial cells in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 34, p. 1360-1365, 1990.

RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESÚS, M. N., MARZAL, P. C., JUNIOR, H. F. A., TEMPONE, A. G. Antimonias empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím. Nova.*, v. 26, p. 550-555, 2003.

ROMERO, E.L.; MORILLA, M.J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert Opin. Drug Delivery*, v. 5, p. 805-823, 2008.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. *Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Fifth Edition. London UK and Am. Pharm. Assoc., Washington, USA, 2005.

SABRA, R.; TAKAHASHI, K.; BRANCH, R.A.; BARD, K.F. Mechanisms of amphotericin B-induced reduction of the glomerular filtration rate: a micropuncture study. *J. Pharm. Exp. Therap.*, v. 253, p. 34-7, 1990.

SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; THOMAS, C.; DUPEYRAT, M.; GARY-BOBO, C.M. Amphotericin B-sterol complex formation and competition with egg phosphatidylcholine: a monolayer study. *Bioch. Bioph. Acta*, v. 944, p. 477-486, 1988.

SHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHMOLKA, I. R. Poloxamers in the pharmaceutical industry. In: TARCHA, P.J. *Polymers for Controlled Drug Delivery*. cap. 10, p.189-214, 1991.

SCHÖFFSKI, P.; FREUND, M.; WUNDER, R.; PETERSEN, D.; KÖHNE, C.H.; HECKER, H.; SCHUBERT, U.; GANSER, A. Safety and toxicity of amphotericin B in glucose 5% or intralipid 20% in neutropenic patients with pneumonia or fever of unknown origin: randomized study. *Br. Med. J.*, v. 317, p. 379-384. 1998.

STRATTON, L. P.; DONG, A; MANNING, M. C.; CARPENTER, J. F. Drug delivery matrix containing native protein precipitates suspended in a poloxamer gel. *J. Pharm. Sci.*, v. 86, n. 9, p. 1006-10, 1997.

TAKÁTS, Z.; VÉKEY, K.; HEGEDÜS, L. Qualitative and quantitative determination of poloxamer surfactants by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 15, n. 10, p. 805-10, 2001.

TITUS, R. G., MARCHAND, M., BOON, T., LOUIS, J. A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Paras. Immun.*, v. 7, p. 545-555, 1985.

TORRADO, J.J.; ESPADA, R.; BALLESTEROS, M.P.; TORRADO-SANTIAGO, S. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J. Pharm. Sci.*, v. 97, p. 2405-2425, 2008.

VARLAM, D.E.; SIDDIQ, M.M.; PARTON, L.A.; RÜSSMANN, H. Apoptosis contributes to amphotericin B- induced nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, n. 3, p. 679-685, 2001.

VERTUT-CROQUIN, A.; BOLARD, J.; CHABBERT, M.; GARY-BOBO, C. Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol-or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study. *Bioch.*, v. 22, p.2939-2944, 1983.

WALSH, T.; FINBERG, R.W.; ARNDT, C.; HIEMENZ, J.; SCHWARTZ, C.; BODENSTEINER, D.; PAPPAS, P.; SEIBEL, N.; GREENBERG, R.N.; DUMMER, S.; SCHUSTER, M.; HOLCENBERG, J.S. Liposomal amphotericin B por empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *New Eng. J. Med.*, v. 340, p. 764-771, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.*

ZHANG, L.; PARSONS, D. L.; NAVARRE, C.; KOMPELLA, U. B. Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *J. Controlled Release*, v. 85, n. 1-3, p.73-81, 2002.