

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RENATA ALVES DE OLIVEIRA E CASTRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ANTIMÔNIO
TRIVALENTE LIVRE OU EM FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL
CONVENCIONAL, ASSOCIADO OU NÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO, EM
CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM*.**

OURO PRETO

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ANTIMÔNIO TRIVALENTE LIVRE OU EM FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL CONVENCIONAL, ASSOCIADO OU NÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO, EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM*.

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

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Neila Márcia Silva Barcellos

Ouro Preto – Minas Gerais - Brasil

Junho – 2013

C355a Castro, Renata Alves de Oliveira e.
Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico, em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* [manuscrito] / Renata Alves de Oliveira e Castro – 2013.
95 f.: il. color.; graf., tab.; mapas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Simone Aparecida Rezende.
Coorientadora: Prof^a Dr^a Neila Márcia Silva Barcellos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

1. Leishmaniose visceral - Teses. 2. Lipossomos - Teses. 3. Carga parasitária - Teses. 4. Vitamina C - Teses. 5. *Leishmania infantum* - Teses.
I. Rezende, Simone Aparecida. II. Barcellos, Neila Márcia Silva.
III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.37:616.993.161

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



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



Sessão de defesa da 69ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a RENATA ALVES DE OLIVEIRA E CASTRO com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação liposomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico, em camundongos Balb/c infectados com *Leishmania infantum*”, avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 14 de junho de 2013.

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho
UFMG

Prof. Dr. José Mário Barichello
DEFAR/UFOP

Prof.^a Dr.^a Simone Aparecida Rezende
DEACL/UFOP

"Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que,
quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho."

Thomas Jefferson

AGRADECIMENTOS

É realmente difícil agradecer tantas coisas extraordinárias na minha vida. Como não agradecer imensamente minha mãe, Paty e Pedro que desde sempre apoiaram tudo na minha vida, mesmo quando eu disse que iria parar de “trabalhar” e me embrenhar novamente pelos estudos nesse mestrado... e a Vitória que me aguentou (e aguenta) de mau humor ao longo desses dois anos. Nossa como eu amo tanto todos vocês. Meu marido é um capítulo à parte, o William soube se equilibrar nessa corda bamba emocional que virou a minha vida e fazer da nossa relação um porto seguro onde eu posso recarregar as minhas forças... Já disse que te amo hoje?!!!

Meus amigos, mais que amigos... digo parceiros: Carol, Flávia e Maurício fizeram toda a diferença nessa história toda. Com quem mais eu aprenderia a fazer lipossomas e seria companheira para “tirar” nitrogênio à noite, no fim de semana, no Cipharma? Carolzzzz é claro, muito obrigada Rady!!! Flávia e Maurício... há um ditado que diz que os amigos com os quais se pode contar às 4:00 da manhã são os que valem a pena, na minha opinião, os que contam mesmo, são os que trabalham com a gente das 5:00 da manhã até às 7:00 da noite, nos fins de semana, durante dois meses inteiros... é são esses que contam!!!

Letícia, muito obrigada por ter me ensinado o que sabia, com tanta boa vontade, mesmo no fim do seu mestrado. Mirézima, o que seria de mim sem você para me iniciar no Prisma. Muito obrigada Tiago por ter se levantado tantas vezes de sua disputada cadeira para ver minhas *leishs*, o que seria de todos nós sem ele. Amanda, ainda bem que eu tive você no LIP para ser mais brava do que eu, né... obrigada pela paciência e desculpe os “carinhos”. Marina e Fernanda, suportes fiéis na histologia, considero vocês as melhores ICs que eu conheci. Janine, obrigada pelo companheirismo e perseverança. À Pauline, Bijay, Rodrigo, Hellen e ICs muito obrigada por tudo. Aos amigos da minha turma de mestrado, muito obrigada pelo apoio, realmente nossa turma é ótima!!!

Quando eu comecei a pensar em mudar totalmente o rumo da minha vida profissional até então fui procurar a professora Simone. Estava muito insegura com essa reviravolta e o seu apoio foi fundamental. Mais que uma orientadora, ela foi muitas vezes amiga e todos esses fatores nos trouxeram até esse desfecho, obrigada por tudo. Gostaria de agradecer à professora Neila pela orientação e também por colocar a Carol na minha vida. Aos professores Frézard, Sandra e Denise pela colaboração no decorrer desse trabalho e ao professor Luís Carlos pela paciência com os experimentos intermináveis.

Mirela, obrigada por estar sempre à disposição para nos ajudar, tirar nossas dúvidas e nos aguentar, pode estar certa que seu trabalho faz toda a diferença. Ao pessoal do biotério, com quem eu convivi durante esse mestrado, obrigada pelo trabalho sério e comprometido, espero estarmos juntos por muitos anos. Érica, Luciana, Lilian, Lorena e Adriana muito obrigada, mesmo.

Ao Francisco do Laboratório Claudino muito obrigada por entender minha nova opção de vida e ter me liberado prontamente quando cheguei com essa novidade. Ao Sr. Claudino, exemplo de vida e trabalho sério, sou muito grata pela oportunidade de ter trabalhado com o senhor mesmo que por um curto período.

À Bioclin-Quibasa pelo fornecimento dos kits através de seu programa de incentivo à pesquisa científica. Aos profissionais dos laboratórios (LAPAC e LGqA – DEGEO), onde boa parte desse trabalho foi realizada, muito obrigada pelo apoio. À Fapemig pelo apoio e incentivo à pesquisa científica, ao Cipharma pela oportunidade de realização deste trabalho e ao NUPEB por permitir a utilização de sua estrutura aos alunos de outros programas.

Para que vocês não tenham dúvidas de que não houve ordem de prioridade em meus agradecimentos, deixei pra falar sobre os dois mais importantes no final. Pai, muito obrigada por tudo... sua falta física nunca vai me deixar, mas exatamente por ter me ensinado que a única coisa que ninguém pode nos tirar é o conhecimento eu tive forças pra chegar até aqui, fiz muito disso tudo por você e com você. Deus, muito obrigada por todas essas bênçãos.

RESUMO

O presente estudo avaliou a utilização de lipossomas convencionais como veículos vetores do antimônio trivalente, na forma de tártaro emético, bem como sua associação ao ácido ascórbico, para o tratamento da leishmaniose visceral no modelo murino. Lipossomas constituídos por distearoilfosfatidilcolina/colesterol (5:4) foram obtidos pela metodologia de congelamento/descongelamento. A caracterização da formulação mostrou tamanho aproximado de 222,5 nm, índice de polidispersão de 0,214, eficiência de encapsulação de 15%, concentração final de 4 mg SbIII/mL e cinética de liberação bifásica avaliada *in vitro*. Lipossomas vazios, igualmente obtidos e hidratados com tampão fosfato serviram como controle. Camundongos BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas foram inoculados com 1×10^7 promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (cepa C43) por via endovenosa. Após seis semanas de infecção, os animais foram divididos em sete grupos (n=8) e tratados por via intraperitoneal, em dose única com: (1) tampão fosfato, (2) antimônio trivalente (SbIII) - 9 mgSb/Kg, (3) lipossomas vazios, (4) lipossomas de SbIII (9 mgSb/Kg), (5) ácido ascórbico (AA) - 300 mg/kg; (6) associação do AA (300 mg/kg) ao SbIII (9 mgSb/kg) e (7) associação de AA (300 mg/kg) aos lipossomas de SbIII (9 mgSb/kg). Dez dias após o tratamento, os animais foram eutanasiados e avaliou-se: a carga parasitária no fígado, baço e medula óssea pelo método de diluição limitante; o padrão de células do baço por citometria de fluxo; a função renal, hepática e cardíaca por análises bioquímicas e o padrão histopatológico do fígado, rins e coração. Observou-se redução significativa na carga parasitária após tratamento com antimônio trivalente lipossomal no fígado, baço e medula óssea de 47%, 33% e 47%, respectivamente, indicando a capacidade do sistema de vetorização de direcionar o medicamento para esses compartimentos. A administração concomitante do AA e SbIII livre ou em formulação lipossomal não interferiu na atividade leishmanicida do SbIII. Não foi observada diminuição na carga parasitária após tratamento com antimônio trivalente livre em nenhum dos órgãos avaliados. Os resultados mostraram nenhuma alteração no padrão fenotípico de células do baço por citometria de fluxo ou nas funções hepática, cardíaca e renal por análises bioquímicas. As análises histopatológicas mostraram que a coadministração dos lipossomas de SbIII e AA foi capaz de preservar os tecidos hepático e renal quando comparados os diferentes grupos experimentais. Os resultados desse trabalho permitiram concluir que a referida preparação lipossomal representa uma alternativa terapêutica capaz de reduzir a carga parasitária nos diferentes órgãos alvo, com potencial para a eliminação do parasito na medula óssea. A coadministração do AA aos lipossomas de SbIII acarretou redução na toxicidade do SbIII. Em conjunto, nossos dados apontam os benefícios do encapsulamento do SbIII em lipossomas unilamelares demonstrados pela redução das alterações histopatológicas para fígado e rins, particularmente em combinação com AA. Acreditamos que nosso trabalho será útil para a proposição de novos regimes terapêuticos para o tratamento da leishmaniose visceral, garantindo a adesão do paciente à terapia devido à redução dos efeitos colaterais.

Simone Aparecida Rezende (Orientadora)

Renata Alves de Oliveira e Castro (Mestranda)

ABSTRACT

The present study evaluated the utilization of conventional liposomes as carriers of trivalent antimony (SbIII), and its association with ascorbic acid, for the treatment of murine visceral leishmaniasis. Liposomes composed of diestearoylphosphatidylcholine and cholesterol (5:4) were obtained according to the freeze / thaw technique and hydrated in a solution of tartar emetic. Empty liposomes, hydrated in phosphate buffer, served as control vehicles. Characterization of the liposomal formulation revealed size, polydispersity index and encapsulation efficiency of 222.5 nm, 0.214 and 15%, respectively, for a formulation containing 4 mg SbIII/mL. It also displayed biphasic release kinetics *in vitro*. BALB/c mice, aged 6 to 8 weeks, were intravenously inoculated with 1×10^7 *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes (C43 strain). Six weeks post infection, the animals were divided into seven groups (n=8) and treated intraperitoneally, as a single dose, with either (1) phosphate buffer, (2) SbIII at 9 mg Sb/kg, (3) empty liposomes, (4) SbIII-entrapped liposomes at 9 mg Sb/kg, (5) ascorbic acid (AA) at 300 mg/kg, (6) association of AA (300 mg/kg) with SbIII at 9 mg Sb/kg or (7) association of AA (300 mg/kg) with SbIII-entrapped liposomes at 9 mg Sb/kg. Ten days after treatment, animals were euthanized and the parasite load associated to the liver, spleen and bone marrow evaluated through the limiting dilution technique. Immunophenotyping of spleen cells was performed using flow cytometry. Enzyme activities in the serum were used to monitor hepatic, kidney and cardiac functions. Histopathological examinations of the liver, kidney and heart were also conducted. After treatment with SbIII-entrapped liposomes it was observed 47%, 33% and 47%, reductions in parasite load in the liver, spleen and bone marrow, respectively, indicating the ability of such delivery system to target the active principle to these compartments. Parallel administration of ascorbic acid with either free SbIII or SbIII-entrapped liposomes did not interfere with SbIII's leishmanicide activity. No reduction in parasite load was observed after treatment with free SbIII for any of the investigated organs. Our results did not reveal any significant alteration in the profile of spleen cells. In addition, no impairment in the hepatic, renal and cardiac functions were observed. Histopathological analyses demonstrated that the co-administration of ascorbic acid with SbIII-entrapped liposomes was able to preserve the integrity of the hepatic and kidney tissues, in comparison to those from other experimental groups. The obtained results allowed us to conclude that our proposed SbIII liposomal preparation represents a therapeutic alternative able to reduce parasite burden with the potential to eliminate parasitism at the bone marrow. Co-administration of AA and SbIII-entrapped liposomes promoted reduced toxicity of SbIII. Collectively, our data extended the proposed benefits of unilamellar liposomes carrying SbIII by demonstrating their reduced toxicity, particularly in combination with ascorbic acid to the liver and kidney tissues. We believe our investigation can be useful for the proposal of novel therapeutic regimens to successfully treat visceral leishmaniasis aiming to guarantee patient compliance whilst minimizing potential side effects.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1 – INTRODUÇÃO.....	16
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 - Epidemiologia	17
2.2 - Leishmaniose.....	19
2.3 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> e metaciclo gênese	20
2.4 - Modelo murino de leishmaniose	22
2.5 – Leishmaniose e tratamento	23
2.6 - Lipossomas.....	26
2.7 - Lipossomas e Leishmaniose.....	27
2.8 – Antimoniais: mecanismo de ação na leishmaniose	29
2.9 – Ácido ascórbico	31
2.10-Função renal, cardíaca e hepática.....	32
2.11 – Alterações histopatológicas na leishmaniose visceral	34
4 - OBJETIVOS	36
4.1 - Objetivo geral.....	36
4.2 - Objetivos específicos	36
5 - MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 - Cepa de <i>Leishmania infantum</i>	37
5.2 - Manutenção da cepa C43 e curva de crescimento.....	37
5.3 - Tropismo tecidual dos parasitos da cepa C43	37
5.4 – Preparo dos lipossomas	40
5.5 – Determinação da eficiência de encapsulação	41
5.6 – Tamanho e índice de polidispersão	41
5.7 – Liberação <i>in vitro</i> de antimônio lipossomal	42
5.8 – Avaliação da estabilidade da formulação de lipossomas.....	42
5.9 - Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico.....	43

5.10 – Avaliação e análise do fenótipo das células do baço por citometria de fluxo, após administração das formulações propostas em animais infectados por <i>L. infantum</i>	44
5.11 – Análises bioquímicas:.....	47
5.11 – Análises histopatológicas:	47
5.12 – Análises estatísticas	48
6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1 - Curva de crescimento da cepa C43	49
6.2 - Tropismo tecidual dos parasitos da cepa C43	49
6.3 - Determinação da eficiência de encapsulação	52
6.4 - Tamanho e índice de polidispersão	53
6.5 – Liberação <i>in vitro</i> de antimônio lipossomal	54
6.6 - Avaliação da estabilidade da formulação de lipossomas	56
6.7 - Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico.....	57
6.7.1 - Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional.....	58
6.7.2 - Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ao ácido ascórbico.....	62
6.8 - Determinação do perfil fenotípico das células do baço após administração das formulações propostas em animais infectados por <i>L. infantum</i> ;	65
6.9- Avaliação das funções hepática, cardíaca e renal em BALB/c infectados e submetidos a diferentes tratamentos.	68
6.9.2 – Avaliação bioquímica da função hepática	69
6.9.3 – Avaliação bioquímica da função cardíaca	71
6.9.1 – Avaliação bioquímica da função renal	73
6.10- Identificação das alterações histopatológicas nos tecidos hepático, cardíaco e renal induzidas pela administração das formulações propostas em animais infectados por <i>L. infantum</i>	74
6.10.1 – Análises histopatológicas do tecido hepático	75
6.10.1 – Análises histopatológicas do tecido cardíaco	79
6.10.1 – Análises histopatológicas do tecido renal.....	81
7 - SUMÁRIO DE RESULTADOS	8
8 - CONCLUSÃO	9
9 - REFERÊNCIAS	10

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sinais clínicos da leishmaniose	20
Figura 2. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	22
Figura 3. Principais agentes leishmanicidas para o tratamento	26
Figura 4. Modelo proposto para o mecanismo de ação de antimoniais pentavalentes	31
Figura 5. Delineamento experimental I	38
Figura 6. Preparação dos Lipossomas	40
Figura 7. Esquema representativo da avaliação da atividade leishmanicida e toxicidade acarretada pelos diversos tratamentos	44
Figura 8. Estratégia de análise da subpopulação de linfócitos T	46
Figura 9. Estratégia de análise da subpopulação de linfócitos B	46
Figura 10. Estratégia de análise da população de macrófagos	46
Figura 11. Curva de crescimento <i>in vitro</i> dos parasitos da cepa C43 de <i>L. infantum</i> cultivada em meio Grace's completo	49
Figura 12. Carga parasitária do fígado, baço e medula óssea de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i>	52
Figura 13. Representação gráfica do diâmetro médio e índice de polidispersão referente à amostra 3 de lipossomas de SbIII	54
Figura 14. Gráfico de liberação do SbIII encapsulado em lipossomas convencionais em função do tempo a 37°C	55
Figura 15. Gráfico de liberação do SbIII encapsulado em lipossomas convencionais em função do tempo a 2-8°C por um período de 30 dias	57
Figura 16. Avaliação da carga parasitária de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos I	60
Figura 17. Avaliação da carga parasitária de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos II	63
Figura 18. Perfil imunofenotípico, no contexto <i>ex vivo</i> , de células do baço de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	66
Figura 19. Perfil da resposta imune em macrófagos, no contexto <i>ex vivo</i> , do baço de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	67
Figura 20. Avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	70

Figura 21. Avaliação bioquímica da função cardíaca de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	72
Figura 22. Avaliação bioquímica da função renal de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	74
Figura 23. Fotomicrografias dos cortes histológicos (5µm, HE) representativos das alterações no fígado de comundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	76
Figura 24. Fotomicrografias dos cortes histológicos (5µm, HE) representativos das alterações no coração de comundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	80
Figura 25. Fotomicrografias dos cortes histológicos (5µm, HE) representativos das alterações nos rins de comundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência estimada e reportada para leishmaniose visceral no Brasil e diversas regiões do mundo	18
Tabela 2. Anticorpos utilizados para a avaliação imunofenotípica das células de baço de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	45
Tabela 3. Dosagem de antimônio trivalente em amostras de lipossomas convencionais	52
Tabela 4. Diâmetro médio e índice de polidispersão da população de lipossomas de três preparações independentes analisadas em quintuplicata	54
Tabela 5. Parâmetros indicadores da liberação do antimônio trivalente dos lipossomas a 37°C	55
Tabela 6. Liberação de medicamento a partir da formulação de lipossomas contendo SbIII durante o período de 30 dias	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido ascórbico

ACR2 – Antimoniato redutase

ANOVA – Análise de variância

AQP1 – Aquaporina do tipo 1

CCA – Centro de Ciência Animal

CHOL – Colesterol

Cys – Cisteína

Cys-Gly – Cisteína-glicina

DALYs – *Disability-adjusted life years*

DCs – Células dendríticas

DEGEO – Departamento de Geologia

DMEM – Meio essencial mínimo Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSPC – Distearoilfosfatidilcolina

ECG - Eletrocardiograma

GSH – Glutathione

GS-M – Complexo glutathione-metal

HDL –High density lipoproteins

HE – coloração por hematoxilina e eosina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

ICP/OES – Espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado

IFN- γ – Interferon-gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IP – Intraperitoneal

LAPAC – Laboratório Piloto de Análises Clínicas

LGqA – Laboratório de Geoquímica

LIT – *Liver infusion tryptone*

LPC – Laboratório de Pesquisas Clínicas

LPG – Lipofosfoglicano conjugado

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

LV – Leishmaniose visceral

MHC II - Complexo principal de histocompatibilidade de classe II

NK – Célula *Natural Killer*

NTDs – *Neglected tropical diseases*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

pH – Potencial hidrogeniônico

psi – Libra por polegada quadrada

RAPD - *Random amplification of polymorphic DNA*

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

SbIII – Antimônio trivalente

SbV – Antimônio pentavalente

SFB – Soro fetal bovino

SFM – Sistema fagocítico mononuclear

T CD4⁺ - Linfócito T auxiliar

T CD8⁺ - Linfócito T citotóxico

T(SH)₂ – Tripanotiona

TDR1 – Redutase dependente de tiol

TGF-β – Fator transformador de crescimento beta

TR – Tripanotiona redutase

T_t - Temperatura de transição de fase

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

v: v – Volume/volume

1 – INTRODUÇÃO

O antimônio trivalente - SbIII - possui eficácia no tratamento da leishmaniose cutâneo mucosa, fato constatado por Gaspar Viana no início do século passado (VIANNA, 1912). Historicamente, o SbIII foi o primeiro medicamento utilizado com sucesso para o tratamento da esquistossomose (CHRISTOPHERSON, 1918). Entretanto, a ocorrência de graves efeitos colaterais decorrentes de seu uso levou à substituição desses compostos pelo antimônio pentavalente - SbV. Alguns estudos sugerem, como um dos mecanismos de ação do composto, a redução *in vivo* do SbV a SbIII, sendo esta a forma ativa e tóxica do antimônio, a qual interage com grupos sulfidríla de algumas proteínas do parasito acarretando a perda de função das mesmas (DEMICHELI *et al.*, 2002; DEMICHELI; FRÉZARD, 2005). A terapia farmacológica das leishmanioses com os antimoniais pentavalentes apresenta algumas limitações, dentre as quais podem ser citadas: o esquema terapêutico em administrações diárias por via parenteral (endovenosa), em períodos de 20-40 dias (DEMICHELI; FRÉZARD, 2005), a baixa adesão terapêutica e o desenvolvimento de resistência pelo parasito em alguns pacientes (MARSDEN, 1985; BERMAN, 1997). Desta forma, a Organização Mundial de Saúde - OMS - recomenda e incentiva a pesquisa de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose (DEMICHELI; FRÉZARD, 2005). Considerando-se lipossomos convencionais como vetores eficientes de antimoniais às células do sistema fagocítico mononuclear (FRÉZARD, 1999) e os bons resultados obtidos em estudos da cardiotoxicidade do tártaro emético (SbIII) nestas formulações (MACIEL *et al.*, 2010; REIS, 2010) espera-se uma potenciação da ação do SbIII, com reduzida toxicidade. Além disso, a diminuição dos efeitos tóxicos do arsênio (semimetal quimicamente comparável ao antimônio) coadministrado ao ácido ascórbico (REIS, 2010) aventou a possibilidade de efeito semelhante com sua associação ao SbIII para o tratamento da leishmaniose. Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do SbIII administrado na forma livre ou lipossomal, associado ou não ao ácido ascórbico (AA), por via intraperitoneal, no tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*.

Palavras chave: leishmaniose visceral, lipossomas, carga parasitária, tratamento, camundongo BALB/c, ácido ascórbico, antimônio trivalente, *Leishmania infantum*

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Quando William Leishman e Charles Donovan isolaram parasitos do baço de pacientes em 1903, não se tinha ideia do quão prevalente ele se tornaria em todo o planeta no século XXI. Desde então, muito se descobriu sobre o parasito causador da leishmaniose visceral (LV), o protozoário então classificado como *Leishmania donovani*. Hoje se sabe que parasitos desse gênero distribuem-se em várias espécies, causadoras de diferentes síndromes com sinais e sintomas clínicos extremamente distintos. Seu peculiar ciclo de vida permitiu a disseminação desse protozoário pelo Velho e Novo Mundo utilizando diferentes vetores e reservatórios animais variados. A capacidade de evadir o sistema imune faz com que essa espécie se mantenha da maneira mais improvável, multiplicando-se nas próprias células de defesa do hospedeiro. Essas e outras tantas características da *Leishmania sp.* fazem com que hoje, mais de um século após seu isolamento, ainda não se tenha encontrado um tratamento seguro e eficaz contra o protozoário causador das leishmanioses.

2.1 - Epidemiologia

A leishmaniose, juntamente a outras doenças como filariose, esquistossomose, doença de Chagas, oncocercose, ascaridíase e lepra, são classificadas como "neglected tropical diseases" (NTDs), com tradução para o português como doenças tropicais negligenciadas. Em 2003, a OMS iniciou uma mudança de paradigma no controle e eliminação dessas doenças. Nesse intuito, a OMS reconhece que o controle das NTDs pode ser alcançado desde que três requisitos principais sejam atendidos: (1) atenção e ações disponibilizadas às populações afetadas e não às NTDs que as acometem; (2) intervenções integrando medidas de controle e tratamento (3) geração de recursos para controle e erradicação das NTDs (WHO, 2010).

Em se tratando de NTDs, os dados epidemiológicos são desconhecidos, esparsos e pouco confiáveis, uma vez que a subnotificação de dados referentes a novos casos e a mortalidade relacionada a essas doenças é uma constante nos serviços implantados nos diversos países. Para a leishmaniose, sabe-se, por um estudo atualizado de 2012, que um total de 98 países e 3 territórios em 5 continentes apresentam transmissão endêmica. A contagem oficial dos novos casos indica o crescimento anual de 58.000 casos de LV e 220.000 casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA). A magnitude de subnotificações para a LV é variável, sendo considerada leve (1,2 - 1,8

vezes) para o Brasil e grave (4,0 - 8,0 vezes) para os dados provenientes da Índia, quando considerados os dados não oficiais fornecidos pelos governos. Em se tratando da LTA, as subnotificações estão em torno de 5 a 10 vezes. Baseado nessas estimativas, as ocorrências anuais variam de 0,2 a 0,4 milhões e 0,7 a 1,2 milhões de novos casos para LV e LTA, respectivamente (ALVAR *et al.*, 2012). Com base em dados notificados e levando-se em conta o padrão de subnotificação anteriormente citado, a tabela 1 expressa o número de casos de LV reportados e estimados.

Tabela 1: Incidência estimada e reportada para LV no Brasil e diversas regiões do mundo. Adaptado de ALVAR *et al.*, 2012

	LV casos reportados/ano	Período de coleta de dados	LV casos estimados/ano
Brasil	3.481	2003-2007	4.200 a 6.300
Américas	3.662	5 anos	4.500 a 6.800
África Oriental	8.569	5 anos	29.400 a 56.700
Mediterrâneo	875	5 anos	1.200 a 2.000
Oriente Médio à Ásia Central	2.496	5 anos	5.000 a 10.000
Sul da Ásia	42.623	5 anos	162.100 a 313.600

A severidade dos sinais e sintomas causados pela LV apresenta-se como um importante impacto econômico nos países onde a doença é prevalente. O número de DALYs (*disability-adjusted life years*) adotado para uma doença em um dado período permite uma estimativa dos anos de vida produtiva perdidos em decorrência da morbidade causada pela patologia e mortalidade prematura. Segundo dados da OMS, o número de DALYs para as leishmanioses é estimado em 45.000 dias nas Américas (WHO, 2010). Com base nos dados apresentados, pode-se inferir que para cada brasileiro acometido pela leishmaniose perde-se em média 12 anos de sua vida produtiva.

2.2 - Leishmaniose

A leishmaniose é uma classe de doenças crônico debilitantes, endêmica em áreas tropicais e subtropicais. Causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é transmitida entre hospedeiros mamíferos por insetos vetores flebotomíneos e caracterizada por sua diversidade e complexidade (HERWALDT, 1999). As diferentes manifestações clínicas da leishmaniose resultam de uma combinação de fatores entre a espécie do parasito causador da infecção e a resposta imune montada pelo hospedeiro em resposta ao protozoário (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

A LTA subdivide-se em diferentes formas clínicas com sinais e sintomas característicos. A leishmaniose cutânea é causada principalmente por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis*, no Novo Mundo e *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica*, no Velho Mundo. Caracteriza-se por uma ou várias úlceras nos locais de picada que se curam espontaneamente, embora de forma lenta, em indivíduos imunocompetentes. A leishmaniose cutâneo-difusa ocorre por disseminação do parasito por via hematogênica ou linfática com consequente formação de lesões não contíguas. A *L. braziliensis* é a principal causadora dessa manifestação clínica da leishmaniose. Na leishmaniose muco-cutânea, os pacientes sofrem com ulcerações desfigurantes progressivas acometendo nariz, nasofaringe e laringe. Resultantes de uma resposta imune exacerbada e ineficaz à *L. braziliensis*, as ulcerações podem ocorrer meses ou anos após o primeiro episódio de leishmaniose cutânea. Por último, a leishmaniose difusa apresenta-se por lesões difusas não ulceradas e ricas em parasitos. Decorre de um processo anérgico caracterizado pela resposta de linfócitos T ausente ou muito prejudicada. Os principais agentes etiológicos são *Leishmania amazonensis* e *Leishmania pifanoi* (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; HERWALDT, 1999; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

A LV apresenta-se como a forma mais grave da doença. É causada por *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *L. tropica* na Europa, Ásia e África, enquanto nas Américas as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* são as responsáveis pelas infecções (HERWALDT, 1999). O tropismo para órgãos como o fígado, baço e medula óssea é o responsável pelos sinais e sintomas característicos dessa enfermidade. As manifestações clínicas aparecem, geralmente, após 3 meses de infecção. Febre tipicamente noturna, taquicardia, fadiga, perda de apetite, diarreia, perda de peso e tosse são os sinais clínicos iniciais. Hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (IgG e IgM) são achados laboratoriais característicos. O paciente evolui para um quadro de hepatoesplenomegalia e

o comprometimento dos órgãos afetados leva a um quadro de caquexia podendo evoluir a óbito (HERWALDT, 1999; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

A estreita relação do parasito causador da leishmaniose com o sistema imune faz com que pacientes imunocomprometidos sejam extremamente afetados por esta enfermidade. Assim sendo, pacientes acometidos por coinfeções, principalmente pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou desnutridos apresentam-se especialmente debilitados. Casos de coinfeção por *Leishmania sp.* e HIV foram relatados em 35 países. A resposta imune celular e humoral desses pacientes ao parasito é diminuída acarretando aumento da carga parasitária no sangue e medula óssea com conseqüente diminuição da sensibilidade aos testes sorológicos e da resposta ao tratamento regularmente adotado. A morbidade e mortalidade em pacientes com esse perfil é considerada alta e apresenta-se como novo foco para a saúde pública (HERWALDT, 1999; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Figura 1: Sinais clínicos da leishmaniose. a –leishmaniose cutânea/ b – leishmaniose mucocutânea/ c – leishmaniose visceral. Adaptada de CHAPPUIS *et al.*, 2007.

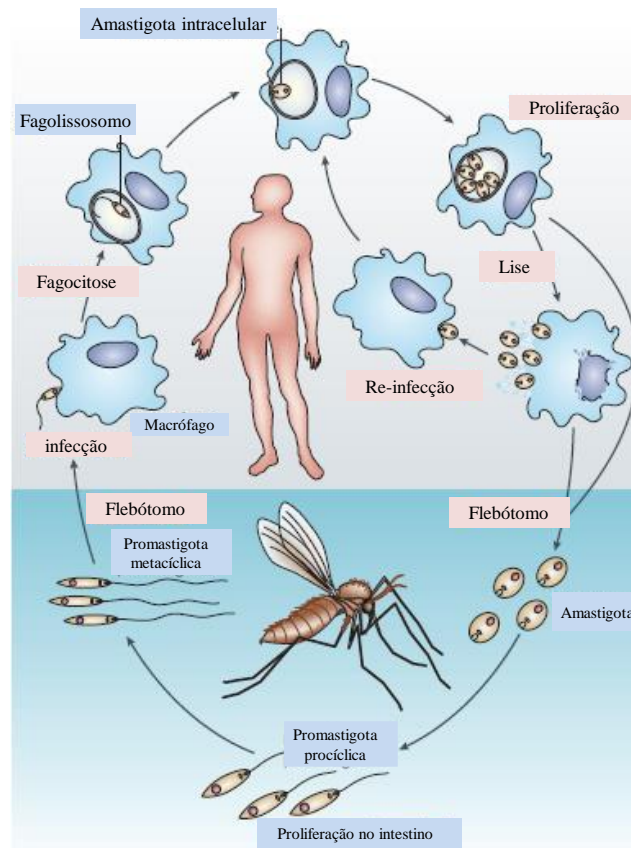


2.3 - Ciclo de vida da *Leishmania* e metaciclogênese

O intrincado ciclo celular do parasito, somado às alterações de sua superfície celular, possibilita a evasão ao sistema imune e conseqüente proliferação nos diversos hospedeiros parasitados (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). O ciclo de vida do parasito inicia-se quando insetos vetores *Phlebotomus sp.* no Velho Mundo e *Lutzomyia sp.* no Novo Mundo infectam-se durante o repasto sanguíneo em indivíduos infectados (ciclo antroponótico) ou em reservatórios animais (ciclo zoonótico). Essa infecção ocorre em decorrência da ingestão de macrófagos que albergam formas amastigotas (3-7 µm de diâmetro) intracelulares obrigatórias as quais são liberadas

no intestino anterior dos insetos. Imediatamente após a ingestão, as formas amastigotas transformam-se em formas alongadas, flageladas e extracelulares denominadas promastigotas (10-20 μ m) capazes de multiplicar-se por divisão binária após migrarem para o trato alimentar do inseto. A maior parte da superfície e flagelo das promastigotas é recoberta por lipofosfoglicano glicoconjugado (LPG) formando um denso glicocálix. Sutis diferenças estruturais nas formas promastigotas permitem subdividi-las em metacíclicas e procíclicas. Promastigotas procíclicas expressam pequenas moléculas de LPG e, durante cultura *in vitro*, são extremamente sensíveis à lise mediada pelo complemento. Promastigotas metacíclicas apresentam ligações de α -arabinose acopladas a repetidos dissacarídeos à β -galactose terminal do LPG promovendo o alongamento deste constituinte de membrana em duas ou três vezes. Com isso, ocorre ativação do complemento em resposta às formas promastigotas metacíclicas não ocorrendo, entretanto, lise decorrente de formação de poros em sua membrana. A migração das formas metacíclicas para o intestino médio e probóscida dos insetos vetores permite a infecção de hospedeiros mamíferos durante novo repasto sanguíneo do vetor infectado. A saliva do flebotomíneo é inoculada juntamente com formas metacíclicas e é capaz de impedir a morte dos parasitos pela ação inibitória de macrófagos acarretando queda na produção de óxido nítrico e radicais superóxido por essas células. Uma vez no hospedeiro mamífero, as promastigotas são internalizadas por macrófagos e rapidamente convertem-se em amastigotas, multiplicando-se avidamente no interior dos fagolisossomos de macrófagos e eventualmente ocasionam a lise celular. As amastigotas liberadas são capturadas por outros macrófagos promovendo a continuidade do ciclo. Por fim, todos os órgãos com alta concentração de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) estão parasitados nos casos de LV, especialmente fígado, baço e 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.



2.4 - Modelo murino de leishmaniose

Animais de laboratório apresentam-se como os melhores modelos para a caracterização de doenças e do impacto acarretado ao hospedeiro. Além disso, a progressão da LV é dependente da espécie de *Leishmania* que provoca a infecção, da concentração do inóculo de parasitos e a rota da infecção, bem como da genética e do estado imunológico do hospedeiro (NIETO *et al.*, 2011). Camundongos BALB/c são naturalmente susceptíveis à *L. infantum* e *L. donovani*. Está bem documentado que a resposta imune mediada por células Th1 previne a infecção por *Leishmania* através da indução de interferon gama (IFN- γ) com consequente ativação de macrófagos e morte dos parasitos (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). Entretanto, camundongos BALB/c montam

resposta celular Th2 com secreção de citocinas IL-4, IL-5 e/ou IL-13 ocasionando, assim, a progressão da doença (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011).

Assim, quando BALB/c são infectados por *L. donovani* ocorre uma susceptibilidade inicial, entretanto, nos estágios tardios pós-infecção ocorre um controle na carga parasitária, sendo esta mantida em baixos níveis durante a infecção crônica. Nesses animais, o controle da infecção, está associado à resposta imune mediada por células envolvendo linfócito T CD4+ e CD8+, a produção de IFN- γ por células T no baço e a formação de granulomas hepáticos. No fígado de camundongos BALB/c, logo após a infecção, as amastigotas expandem-se rapidamente, mas os parasitos são finalmente contidos. Os macrófagos residuais parasitados por amastigotas induzem uma inflamação granulomatosa no tecido hepático facilitando o controle da infecção. Entretanto, quando o baço e a medula óssea são avaliados, estes se apresentam como sítios de infecção crônica, onde os parasitos permanecem por toda a vida do animal (CARRIÓN *et al*, 2006).

Entre os fatores genéticos que norteiam a evolução da infecção por *Leishmania* estão os genes *Slc11a1* e o *H2* (NIETO *et al*, 2011). Camundongos susceptíveis, BALB/c e C57BL/6, possuem o gene *Slc11a1* não funcional, resultando em grande multiplicação do parasito nas primeiras duas semanas de infecção. O controle tardio da infecção é regulado pelo gene *H2*, responsável por codificar as moléculas apresentadoras de antígeno –MHC- nos camundongos. Esta característica permite o controle tardio da infecção hepática indicando o importante papel da resposta imune no controle de crescimento do parasito (STANLEY; ENGWERDA, 2007; NIETO *et al*, 2011).

2.5 – Leishmaniose e tratamento

A OMS recomenda uma intensificação na gestão dos processos na tentativa de promover o controle das NTDs. Assim, deve-se dar prioridade aos indivíduos infectados e às pessoas em risco de contrair as infecções. Os processos adotados nesse sentido dividem-se em (1) fazer o diagnóstico o mais precocemente possível, (2) proporcionar o tratamento para reduzir a infecção e morbidade decorrente e (3) gerir satisfatoriamente as complicações da doença. Estas são as principais intervenções para NTDs que não possuem tratamento profilático disponível. No caso da leishmaniose, a OMS recomenda prevenção, controle e diagnóstico, o qual deve ser simplificado sem perder a sensibilidade (WHO, 2010). As iniciativas de tratamento contribuem para o controle

da leishmaniose uma vez que os pacientes infectados são considerados reservatórios de parasitos em áreas de ciclo antroponótico (CHAPPUIS *et al.*, 2007). A escolha do tratamento clínico depende de vários fatores como as características clínicas da doença e, fatores relacionados ao fármaco como segurança, eficácia e custo (GRADONI; GRAMICCIA; SCALONE, 2003).

A leishmaniose é tratável, mas a complexidade das diversas formas clínicas, a variação de sensibilidade entre as espécies do parasito e o aumento dos níveis de resistência aos antimoniais fazem com que os esquemas adotados sejam extremamente variáveis (HERWALDT, 1999; CROFT, 2001). Infelizmente, para a leishmaniose, os tratamentos mais eficazes são os de esquemas terapêuticos mais complexos e com efeitos tóxicos mais acentuados (HERWALDT, 1999).

Atualmente, os tratamentos adotados para a LV constituem a administração de antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paramomicina ou miltefosina (HERWALDT, 1999; CROFT, 2001; CHAPPUIS *et al.*, 2007; WHO, 2010). Os antimoniais pentavalentes apresentam-se como a primeira linha de tratamento contra a LV, nos últimos 70 anos, em diversas áreas do mundo (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Os principais antimoniais em uso são os complexos de SbV com o N-metilglucamina (antimoniato de meglumina) e o gluconato de sódio (estibogluconato de sódio) os quais se apresentam no mercado como Glucantime[®] e Pentostam[®], respectivamente (CROFT, 2001; FRÉZARD *et al.*, 2005b). A administração por via parenteral (endovenosa ou intramuscular) é realizada em um esquema posológico que pode variar de 20 a 40 dias. Nessas condições, os efeitos colaterais que incluem arritmias e pancreatite aguda são frequentes (FRÉZARD *et al.*, 2005b; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Outras limitações de sua utilização incluem a restrição do uso em pacientes menores de 2 e maiores de 45 anos e de pacientes com doença avançada ou desnutrição severa. Nesses casos, o risco de morte devido à toxicidade, sua ação lenta, as complicações decorrentes da LV ou a combinação de todos esses fatores é eminente (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

As espécies de *Leishmania* apresentam diferenças intrínsecas de sensibilidade aos antimoniais (CROFT, 2001) e, em cerca de 3 – 5% dos pacientes verifica-se falha no tratamento. Em algumas regiões da Índia, ocorre uma falha ainda maior, 60% dos pacientes não tratados anteriormente com antimoniais são refratários ao tratamento (SUNDAR *et al.*, 2008). Além das diferenças inerentes às espécies de *Leishmania*, as baixas doses administradas e a descontinuidade do tratamento estão entre as maiores causas da resistência aos antimoniais. Os parâmetros farmacocinéticos dos antimoniais pentavalentes são os responsáveis pelo longo esquema terapêutico adotado para esse fármaco. Para se obter um nível plasmático efetivo de SbV, doses altas precisam ser injetadas por via parenteral, não superando a dose máxima permitida de 850 mg de SbV por dia. A eliminação do Sb segue uma curva bifásica, consistindo de uma fase rápida e uma fase lenta, com

tempo de meia-vida de 2 e 72h, respectivamente. O baço é o órgão que mais acumula esse metal (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1988).

A anfotericina B possui ação contra as diversas formas de leishmaniose. Devido a seus efeitos adversos, serve de segunda linha de tratamento para essa enfermidade (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1988). A administração da anfotericina B dá-se por via parenteral em um regime de 15 infusões em dias alternados as quais provocam dor, febre e rigidez local. Com o decorrer do tratamento, o paciente pode apresentar hipocalcemia e nefrotoxicidade (CHAPPUIS *et al.*, 2007). A atividade da anfotericina B está ligada a sua afinidade pelo ergosterol típico de espécies de *Leishmania*, a interação do 24-ergosterol ao fármaco promove uma mudança na composição da membrana com conseqüente formação de poros ocasionando a perda de íons e morte do parasito. A diferença de ação entre as espécies relaciona-se à variação do tipo e a quantidade dos esteróis de membrana (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1988; CROFT, 2001).

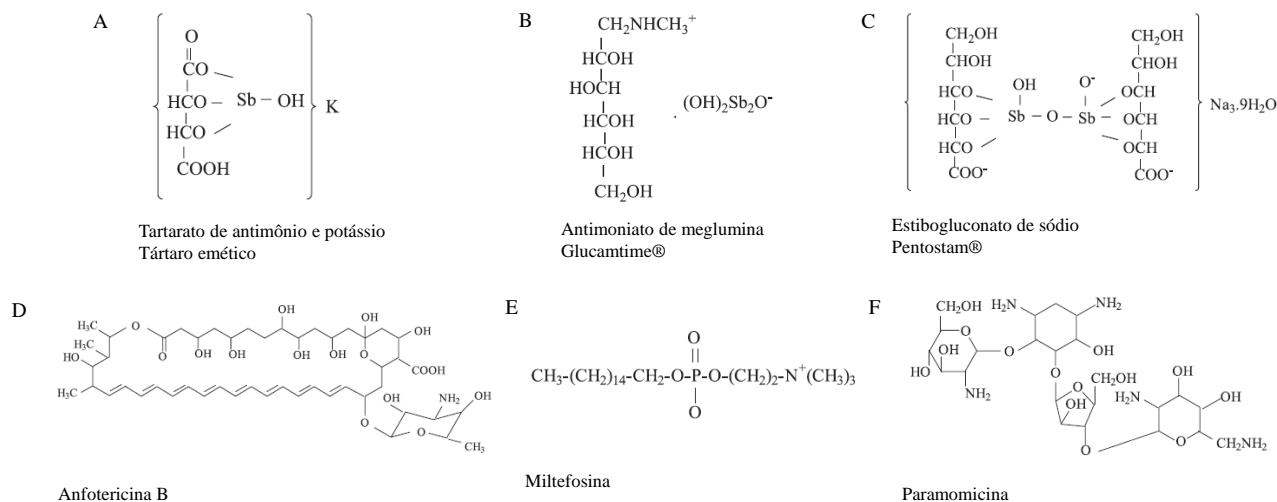
A anfotericina B lipossomal é tida como a melhor alternativa para o tratamento da LV na atualidade e adotada como primeira linha de tratamento na Europa e Estados Unidos (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Um estudo realizado por Sundar e colaboradores (2010a) mostraram que o tratamento com lipossoma de anfotericina B (AmBisome® - 10 mg/Kg) em dose única apresenta os mesmos resultados obtidos pela administração de anfotericina B livre (Fungizon® - 1 mg/Kg) por 10 dias.

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo com boa atividade leishmanicida em formulações parenterais (HERWALDT, 1999; CROFT, 2001; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Os índices terapêuticos para a paramomicina em doses de 12 a 16 mg/kg/dia por 14 a 21 dias são similares aos encontrados para o tratamento com antimoniais. Além disso, este medicamento apresenta bom resultado em pacientes com parasitos resistentes aos antimoniais pentavalentes. Associações de fármacos têm sido testadas para o tratamento da LV, objetivando-se uma terapia combinada capaz de aumentar a tolerabilidade e compatibilidade, aumentar a resposta imunológica para a redução do período de tratamento, assegurando assim o efeito terapêutico (JHA, 2006). Assim, a coadministração da paramomicina aos antimoniais pentavalentes pode diminuir o período de tratamento adotado (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1988).

A miltefosina, inicialmente utilizada como um fármaco anticâncer, apresenta-se como a única substância ativa para o tratamento de LV administrada por formulação oral. Os efeitos colaterais relatados incluem toxicidade gastrointestinal, hepática e renal além de teratogenia. A *Leishmania* desenvolve facilmente resistência à miltefosina *in vitro* (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Esta característica poderia explicar o aumento de resistência da *L. infantum* à miltefosina na Europa com

o advento do uso desse fármaco no tratamento de cães infectados em virtude da descontinuidade de tratamentos.

Figura 3: Principais agentes leishmanicidas empregados no tratamento das leishmanioses. A – Tartarato de antimônio e potássio – Tártaro emético/ B – Antimoniato de meglumina - Glucantime®/ C – Estibogluconato de sódio - Pentostam®/ D – Anfotericina B/ E – Miltefosina/ F - Paramomicina. Adaptada de RATH *et al.*, 2003.



2.6 - Lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas microscópicas constituídas por uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios separadas entre si e do meio externo por compartimentos aquosos. Facilmente obtidos a partir de qualquer substância anfifílica formadora da fase lamelar, podem carrear substâncias hidrofílicas ou lipofílicas em seus compartimentos aquosos ou adsorvidos à membrana, respectivamente (FRÉZARD *et al.*, 2005b; BATISTA *et al.*, 2007; MACHADO; GNOATTO; KLUPPEL, 2007). A utilização de vesículas lipossomais, constituídas de lipídios naturais, como sistemas transportadores de medicamentos, apresentam elevada biocompatibilidade perturbando minimamente a homeostase. Os lipossomas são sistemas extremamente versáteis e suas características de tamanho, lamelaridade, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno são variáveis que podem ser ajustadas conforme os quesitos farmacêuticos e farmacológicos desejados. A fluidez da membrana dos lipossomas é determinada de acordo com a composição lipídica da mesma. Assim, as membranas lipossomais encontram-se “fluidas” ou cristal-líquido quando a temperatura de transição de fase (T_i) é menor que a temperatura do meio em estudo e “rígidas” ou gel quando a T_i é maior. A adição de colesterol

à composição lipídica diminui a fluidez das membranas no estado cristal-líquido e diminui a rigidez das membranas em estado gel, estabilizando a formulação. A capacidade de encapsulação de uma substância em lipossomas é dada pela taxa de encapsulação ou relação substância encapsulada/lipídio. Taxas de encapsulação próximas a 100% podem ser alcançadas em casos de substâncias lipofílicas, mas em casos de substâncias hidrossolúveis é teoricamente impossível, em virtude da coexistência dos compartimentos aquosos interno e o meio externo. É exatamente a coexistência desses compartimentos que norteia a liberação do princípio ativo hidrossolúvel para o meio externo através do gradiente de concentração formado. Em se tratando de substâncias lipofílicas, o coeficiente de partição da substância entre a membrana e a fase aquosa norteará a liberação (FRÉZARD *et al.*, 2005b).

Os lipossomas são capazes de reter o princípio ativo e protegê-lo *in vivo* de eliminação e degradação rápida. O aumento da biodisponibilidade do princípio ativo decorre de sua lenta liberação, o que reduz a concentração do mesmo no organismo, ao mesmo tempo em que prolonga sua presença (FRÉZARD *et al.*, 2005b).

2.7 - Lipossomas e Leishmaniose

A utilização de lipossomas para o tratamento da leishmaniose tem sido proposta por vários estudos durante as últimas décadas (NEW *et al.*, 1978; ALVING *et al.*, 1978; 1984a; SCHETTINI *et al.*, 2003; 2006a; RIBEIRO *et al.*, 2008). A década de 70 foi marcada pelos primeiros bons resultados na utilização de lipossomas para o carreamento de antimoniais (FRÉZARD *et al.*, 2005b). Hamsters infectados com *L. donovani* e posteriormente tratados com lipossomas de antimoniais pentavalentes apresentaram redução de 50% na carga parasitária, sendo esta redução 700 vezes maior quando comparado com a administração da substância ativa livre (ALVING *et al.*, 1978). Em um estudo do mesmo ano, camundongos previamente infectados com *L. donovani* e tratados com antimoniais trivalentes em diferentes esquemas terapêuticos apresentaram significativa redução da carga parasitária no fígado e, em alguns deles, a completa eliminação do parasito (NEW *et al.*, 1978). Estudos realizados em cães com formulações lipossomais de antimoniais pentavalentes mostraram redução significativa na carga parasitária na pele, linfonodos cervicais, medula óssea, fígado e rins (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Os bons resultados obtidos pela vetorização de fármacos em modelos lipossomais são explicados pelo padrão de distribuição dos lipossomas no organismo regido tanto pelas características das vesículas como tamanho e composição quanto pelas características do sistema circulatório. Os lipossomas convencionais administrados por via endovenosa têm como alvo órgãos como fígado, baço e medula óssea, irrigados por capilares descontínuos, onde são fagocitados por células do SFM. Em contrapartida, a concentração dos mesmos é minimizada em órgãos apresentando capilares contínuos como coração, rins, cérebro, músculos e pele. A fagocitose dos lipossomas pode ser acelerada pelo processo de opsonização através da ligação de opsoninas (IgG ou componente C3b do complemento) aos lipossomas. Neste processo, quanto maiores forem as vesículas, mais rápida será a fagocitose (FRÉZARD *et al.*, 2005b).

O conhecimento da doença alvo bem como suas características, principalmente a localização do parasito, são essenciais para a escolha do tipo de lipossoma a ser empregado. Levando-se em consideração que os parasitos da leishmaniose são infectantes das células do SFM, onde este estabelece seu ciclo no hospedeiro vertebrado, e o destino natural dos lipossomas convencionais serem os órgãos naturalmente ricos nessas mesmas células, pode-se atribuir a esses fatores os bons resultados alcançados por essas terapias experimentais (NEW *et al.*, 1978; ALVING *et al.*, 1978; 1984a; FRÉZARD *et al.*, 2005b).

Formulações lipossomais promovem aumento da concentração de antimoniais pentavalentes no fígado e baço, acarretando também um prolongado efeito do fármaco nesses órgãos (SCHETTINI *et al.*, 2003; 2006a). Além disso, lipossomas pequenos, com diâmetro abaixo de 200 nm, parecem ter acesso facilitado à medula óssea, promovendo a eliminação do parasito albergado nesse tecido (FRÉZARD *et al.*, 2005b). Aspectos inerentes ao aumento do índice terapêutico e o prolongamento da ação do fármaco levaram ao mercado o AmBisome[®], um medicamento a base de anfotericina B encapsulada em lipossomas que diminui os efeitos tóxicos e a frequência de administração do medicamento, maximizando os efeitos terapêuticos.

Os lipossomas aplicados ao tratamento de doenças parasitárias vêm apresentando aumento na eficácia dos tratamentos adotados bem como a redução da toxicidade. Estudos de nosso grupo de pesquisa mostraram que o tratamento experimental da esquistossomose mansônica, com lipossomas de longa circulação de tartaro emético, provocou redução significativa no número de vermes (82%) em comparação ao grupo controle. Além disso, esta formulação promoveu uma redução significativa da toxicidade do tartarato de antimônio e potássio (DE MELO *et al.*, 2003). Uma importante redução de cardiotoxicidade foi comprovada com a administração de tartarato, em formulação lipossomal de longa circulação, em comparação com os dados obtidos pela

administração do fármaco livre. O encurtamento do intervalo QT pela administração deste fármaco nestas formulações pode prever a síncope, parada cardíaca, arritmias e morte súbita (MACIEL *et al.*, 2010).

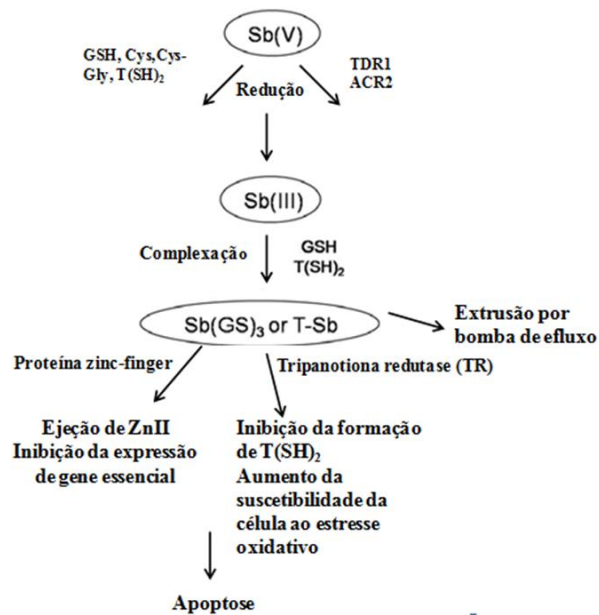
2.8 – Antimoniais: mecanismo de ação na leishmaniose

As primeiras informações acerca da eficácia do tártaro emético – complexo de SbIII - para o tratamento da leishmaniose datam do início do século XX, quando Gaspar Vianna relatou sua atividade no tratamento da leishmaniose mucosa cutânea (VIANNA, 1912). Os trabalhos deste importante médico brasileiro possibilitaram aos doentes acometidos por esta patologia, a esperança de sobrevivência. O uso clínico desses compostos de SbIII acabou por ser interrompido em decorrência de seus severos efeitos colaterais e da concomitante descoberta de fármacos menos tóxicos. Assim, complexos de SbV começaram a ser utilizados na terapêutica a partir da década de 40 (FRÉZARD *et al.*, 2005b).

Com relação ao mecanismo de ação, não há clareza sobre qual das duas formas de antimônio, se o SbV ou o SbIII, é a mais ativa no tratamento da leishmaniose (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Um dos mecanismos de ação propostos para os antimônios sugere que o SbV atuaria como um pró fármaco que através de redução resultaria em SbIII, a forma tóxica e mais ativa deste metal (GOODWIN; PAGE, 1943; SHAKED-MISHAN *et al.*, 2001; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c). Entre os principais agentes redutores propostos estão os tióis. A glutatona (GSH), o principal tiol presente no citosol de células de mamíferos, induz a conversão de SbV a SbIII em uma reação de óxido-redução favorecida em pH ácido e temperaturas elevadas, condições similares às observadas nos fagolisossomos dos macrófagos, onde se encontram as formas amastigotas (SHAKED-MISHAN *et al.*, 2001). Outros tióis como cisteína (Cys), cisteína-glicina (Cys-Gly) e tripanotona (T(SH)₂) também promovem esta redução a 37°C (FRÉZARD *et al.*, 2001a; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c). Enzimas específicas dos parasitos são também responsáveis pela redução de SbV a SbIII. A redutase dependente de tiol (TDR1) é uma delas e está presente em concentração 10 vezes maior nas formas amastigotas, as quais acumulam antimoniais pentavalentes e são mais sensíveis aos antimoniais trivalentes. Tomadas em conjunto, essas informações explicam a alta sensibilidade das formas amastigotas ao SbIII (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004). O SbV é captado, tanto por formas amastigotas quanto promastigotas, através de transportadores de antimoniais pentavalentes ainda não

identificados. O transportador chamado aquagliceroporina (AQP1) foi identificado em *Leishmania* e apresenta-se como o principal transportador do SbIII (GOURBAL *et al.*, 2004). A ação do SbIII está relacionada a sua alta afinidade por ligantes contendo grupos nitrogênio e sulfidrina, destacando-se tióis, peptídeos, proteínas e enzimas (FRÉZARD *et al.*, 2001a; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c). A formação de complexos estáveis entre o SbIII e os tióis acarreta a morte celular (FRÉZARD *et al.*, 2001a; SUN; YAN; CHENG, 2000). Assim que o SbIII entra na célula, este é conjugado à T(SH)₂ e o complexo tanto pode ser sequestrado dentro de vacúolos como exsudado por bombas dependentes de ATP e transportadores ABC (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1996; LÉGARÉ *et al.*, 2001). A resistência da *Leishmania* aos antimoniais é decorrente tanto do aumento da concentração de tióis quanto da baixa expressão de transportadores. Os antimoniais trivalentes interferem no metabolismo de T(SH)₂ pela inibição de TR induzindo um rápido efluxo intracelular de T(SH)₂ e GSH em parasitos do gênero *Leishmania* (CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 1995; WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). A tripanotona redutase (TR) mantém a T(SH)₂ em seu estado reduzido, protegendo assim os tripanosomatídeos. A ligação do SbIII à CCHC da proteína *zinc finger* promove a ejeção do zinco celular interferindo em vários processos celulares. O domínio *zinc finger* coordena átomos de zinco a diversos resíduos de aminoácidos principalmente cisteína e histidina, os quais estão associados a interações de ácidos nucleicos a proteínas e proteínas entre si. A atuação deste domínio está ligada a várias funções celulares indispensáveis à vida como empacotamento de RNA, enovelamento proteico, ativação transcricional, diferenciação e crescimento celular e regulação da apoptose (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c). O tratamento de amastigotas de *L. infantum* com baixas concentrações de SbIII induz a fragmentação do DNA e consequente apoptose (SERENO *et al.*, 2001).

Figura 4: Modelo proposto para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. De acordo com o modelo de pró-fármaco, o SbV é reduzido a SbIII e este exerce a atividade leishmanicida sobre os parasitos. Adaptada FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c.



2.9 – Ácido ascórbico

Vitaminas são nutrientes essenciais requeridos em diversos processos bioquímicos e fisiológicos. Os organismos nem sempre as produzem e, por esta razão, devem ser incluídas na dieta. O ácido ascórbico (vitamina C ou AA) é um antioxidante solúvel em água, instável, facilmente oxidado e que se degrada facilmente em presença de oxigênio, altas temperaturas e substâncias alcalinas. O organismo requer AA em várias funções fisiológicas normais como metabolismo de tirosina, ácido fólico e triptofano; diminuição do colesterol e síntese de carnitina e catecolaminas regulatórias do sistema nervoso; formação de neurotransmissores, absorção de ferro e proteção do organismo contra radicais livres e poluentes ambientais (IQBAL; KHAN, KHATTAK, 2004).

Apesar de o AA estar entre os nutrientes essencialmente necessários ao bom funcionamento do organismo, a quantidade requerida desta substância deve estar ajustada para a realização das funções a serem desenvolvidas. A dose diária de ácido ascórbico a ser utilizada por seres humanos não deve ser superior a 1.000 mg para indivíduos saudáveis. Doses de AA superiores a esse valor acarretam elevação de oxalato e ácido úrico na urina. O índice de saturação de AA no plasma foi alcançado em uma dose de 400mg, não sendo, portanto necessária uma ingestão de maiores quantidades desta vitamina diariamente (LEVINE *et al.*, 1996).

Embora o ácido ascórbico deplete a GSH intracelular, em uma reação não enzimática decorrente da reciclagem de ascorbato reduzido, o que gera um estresse oxidativo prolongado, a característica oxidante ou redutora desta molécula está intimamente relacionada à sua concentração no ambiente celular (DUCONGE *et al.*, 2008). A depleção de GSH foi constatada em um estudo de avaliação da viabilidade e correlação da combinação de trióxido de arsênio e ácido ascórbico na depleção da glutathiona intracelular no tratamento de mieloma múltiplo refratário. Durante o estudo, a utilização de ácido ascórbico reduziu os níveis de GSH durante a administração do mesmo (BAHLIS *et al.*, 2002). As características redutoras do AA como depletor de radicais livres acarretando assim a redução do estresse oxidativo são amplamente conhecidas e ainda hoje estudadas (EBUEHI; OGEDEGBE; EBUEHI, 2012; BOUDOURIS *et al.*, 2012; HARIKRISHNAN *et al.*, 2013). Baseados nestas informações, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram redução da toxicidade cardíaca do SbIII livre em ratos Wistar tratados com dose única de 17 mgSbIII/Kg quando este foi associado ao AA (REIS, 2010).

2.10-Função renal, cardíaca e hepática

O bom funcionamento dos diversos órgãos de um organismo garante a homeostase. A avaliação das funções desses órgãos permite o monitoramento da saúde do indivíduo. Em casos de alterações metabólicas, a mudança no padrão da concentração de substâncias distintas na corrente sanguínea permite diagnosticar, através de dosagens bioquímicas consagradas, o mau funcionamento dos órgãos e sistemas. Diversos metabólitos e enzimas são dosados através de ensaios bioquímicos no intuito de monitorar a homeostase. A função renal é avaliada pela concentração sérica de creatinina e uréia. Avalia-se a função hepática pelas concentrações de bilirrubinas, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e aminotransferases. A função cardíaca por sua vez, é avaliada pelas concentrações plasmáticas de creatinoquinases, lactatodesidrogenase e asparto cetoglutarato aminotransferase.

A desidratação não enzimática da creatina muscular (1 a 2%) resulta na produção de creatinina a qual não é reaproveitada pelo organismo sendo, portanto, apenas um produto dos resíduos da creatina. A creatinina difunde do tecido muscular para o plasma sendo removida inteiramente através da filtração glomerular em velocidade praticamente constante. A excreção da creatinina é proporcional à massa muscular do indivíduo, afetada apenas pela ingestão excessiva de carne, e corresponde a 2% das reservas corpóreas de creatina-fosfato (composto de alta energia).

Devido à constância da excreção da creatinina, a concentração sérica deste metabólito é uma excelente medida para avaliar a função renal (MOTTA *et al*, 2009).

As enzimas são proteínas responsáveis pela catálise de diversas reações intracelulares permitindo o bom funcionamento do organismo. Estão contidas pela membrana celular e dessa maneira sua concentração plasmática está muito abaixo da concentração intracelular. A membrana plasmática é metabolicamente ativa e sua integridade é dependente do metabolismo energético celular. Qualquer alteração no processo de produção de energia celular, desencadeado por episódios endógenos ou exógenos, poderá levar a alterações na permeabilidade da membrana plasmática resultando no extravasamento do conteúdo intracelular e com ele as enzimas citoplasmáticas. Desta forma, alterações nas concentrações plasmáticas das diversas enzimas são consideradas achados clínicos importantes na elucidação de enfermidades com alteração tecidual. A diferente distribuição das enzimas pelos tecidos permite inferir determinada lesão mediante as alterações nas atividades enzimáticas no plasma (KANAAAN *et al*, 2008).

As aminotransferases, também conhecidas como transaminases, são enzimas responsáveis pela catálise da interconversão de aminoácidos em cetoácidos através da transferência de grupos amino. A aspartato cetoglutarato aminotransferase (AST ou TGO) e a alanina cetoglutarato aminotransferase (ALT ou TGP) são as de maior importância clínica. Essas enzimas diferem em sua localização tanto tecidual quanto celular. As ASTs estão contidas 80% nas mitocôndrias das células dos tecidos de diversos órgãos como fígado e músculos cardíacos e esqueléticos. As ALTs, por sua vez, localizam-se integralmente no citossol estando presente principalmente no fígado e sua elevação é raramente encontrada em outras doenças que não as hepáticas (KANAAAN *et al*, 2008).

As creatinoquinases são enzimas que catalisam a transferência do grupo fosfato da fosfocreatina para a adenosina difosfato (ADP) resultando na produção de adenosina trifosfato (ATP) um composto fosfato de alta energia indispensável à energética de músculos e nervos. Sua função é manter os níveis de ATP elevados nos músculos esqueléticos para o desempenho das funções motoras e vitais. A CK-MB é uma isoenzima híbrida da enzima creatinoquinase (CK). Isoenzimas são definidas como formas múltiplas de uma enzima que catalisam uma mesma reação bioquímica possuindo, no entanto, diferenças estruturais que permitem a separação por eletroforese. A CK-MB está distribuída 15 a 40% no músculo cardíaco, 1 a 2% no músculo esquelético e aproximadamente 5% no plasma. Estas diferenças possibilitam a avaliação de importantes alterações na integridade do tecido muscular cardíaco (KANAAAN *et al*, 2008).

2.11 – Alterações histopatológicas na leishmaniose visceral

As alterações histopatológicas apresentadas pelos indivíduos acometidos pela LV são decorrentes da resposta montada pelo hospedeiro ao parasito. Estas alterações estão presentes, em sua grande maioria, nos órgãos naturalmente acometidos pela enfermidade, principalmente aqueles nos quais se concentram as células do SFM. Assim, fígado, baço e medula óssea são os órgãos cujas estruturas e funções estarão comprometidas durante a evolução da doença.

O hospedeiro é capaz de debelar a infecção por *L. donovani* quando apresenta uma resposta imune pró-inflamatória Th1 com a presença das citocinas IL-12 e IFN- γ . Esta ação desencadeia uma resposta complexa no fígado com a formação de granulomas apresentando acúmulo de macrófagos teciduais e o influxo de monócitos provenientes do sangue capazes de exterminar o parasito e induzir quiescência (MURRAY; DELPH-ETIENNE, 2000).

Segundo Gutierrez, Maksem e Reiner (1984), a mudança marcante na histopatologia hepática em camundongos BALB/c infectados por *L. donovani* é a formação de granulomas no fígado, baço e medula óssea. De acordo com este estudo, as alterações hepáticas podem ser detectadas na primeira semana de infecção com a presença de granulomas imaturos, os quais se tornam maduros a partir da segunda semana, atingindo seu diâmetro máximo em dezesseis semanas. Após vinte e quatro semanas, estes estarão envoltos por colágeno. A evolução da infecção no baço desses animais inicia-se na primeira semana com a presença de macrófagos parasitados na polpa vermelha. Na segunda semana, essas células podem ser encontradas também na polpa branca, a distorção da arquitetura esplênica se dá na oitava semana permanecendo até a vigésima quarta semana sem, contudo, haver deposição de colágeno. A medula óssea permanece inalterada na primeira semana de infecção, na segunda semana poucos parasitos são encontrados neste órgão. A infecção evolui e, da quarta à décima quarta semana, acumulam-se os granulomas imaturos sem haver deposição de colágeno.

O mesmo padrão de alteração hepática encontrado em camundongos BALB/c infectados por *L. donovani* no estudo anteriormente citado foi encontrado em cães. O fígado dos animais infectados apresenta reação inflamatória granulomatosa crônica caracterizada pela formação de numerosos granulomas intralobulares de tamanhos variados constituídos de macrófagos parasitados ou não, algumas células epitelióides, poucos linfócitos, células plasmáticas e raros neutrófilos. De maneira geral, as células de Kupffer apresentam-se hiperplasiadas e hipertrofiadas e, em sua maioria, parasitadas (MELO *et al.*, 2009; GIUNCHETTI *et al.*, 2008).

3 – Justificativa

Considerando a LV como uma doença altamente prevalente no mundo e que apresenta elevada morbidade e mortalidade, a pesquisa de novas alternativas terapêuticas para seu tratamento é de suma importância para a saúde humana. O benefício da utilização de nanocarreadores para a administração de fármacos com o objetivo de: diminuir o número de doses; os intervalos de administração; reduzir os efeitos colaterais e direcionar ao local de ação avança novas possibilidades à terapêutica. Ao mesmo tempo, a coadministração de fármacos pode minimizar ainda mais os efeitos colaterais desencadeados pela utilização destas substâncias ativas.

Assim sendo, o conhecimento da aplicação do ácido ascórbico em leishmaniose, a fim de estabelecer a relação benefício/malefício da interação desta vitamina com antimoniais adotados no tratamento da enfermidade apresenta-se como um dos focos deste trabalho. Considerando-se que formulações lipossomais de antimoniato tem apresentado redução de toxicidade e aumento da atividade leishmanicida de maneira dose dependente, espera-se redução da toxicidade pela adição de AA, um potente agente antioxidante, à terapia. A utilização do SbIII em preparações lipossomais vêm de encontro com as recomendações da OMS. Este trabalho avança a possibilidade de se obter o rejuvenescimento de substâncias ativas comprovadamente efetivas contra as NTDs, abandonados em decorrência de efeitos colaterais adversos e assim ampliar o arsenal terapêutico contra moléstias que afligem uma parcela extremamente vulnerável da população mundial.

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial leishmanicida do SbIII livre, na forma lipossomal bem como sua associação ao AA em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*. Espera-se, com isso, a redução da toxicidade do SbIII tanto por sua encapsulação em lipossomas convencionais quanto por sua associação ao AA.

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

Este trabalho teve com objetivo geral a avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, em associação ou não com o ácido ascórbico, em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*.

4.2 - Objetivos específicos

4.2.1 - Identificar o padrão de tropismo tecidual da cepa C43 de *L. infantum*;

4.2.2 – Obter e caracterizar a formulação de lipossomas convencionais de SbIII;

4.2.3 - Avaliar a atividade leishmanicida do SbIII encapsulado em lipossomas convencionais e em sua forma livre;

4.2.4 - Analisar a possível variação de eficácia e toxicidade das formulações propostas com administração concomitante de ácido ascórbico;

4.2.5 - Determinar o padrão de células do baço após administração dos tratamentos propostos em animais infectados por *L. infantum*;

4.2.6 - Avaliar alterações bioquímicas e histopatológicas nos tecidos hepático, cardíaco e renal decorrentes da administração dos tratamentos propostos em camundongos infectados por *L. infantum*;

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Cepa de *Leishmania infantum*

Para a realização desse trabalho, utilizou-se a cepa C43 obtida a partir de um isolado de cão sintomático, caracterizada por *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) como *Leishmania (Leishmania) infantum*, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis do Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) - Cipharma – Universidade Federal de Ouro Preto.

5.2 - Manutenção da cepa C43 e curva de crescimento

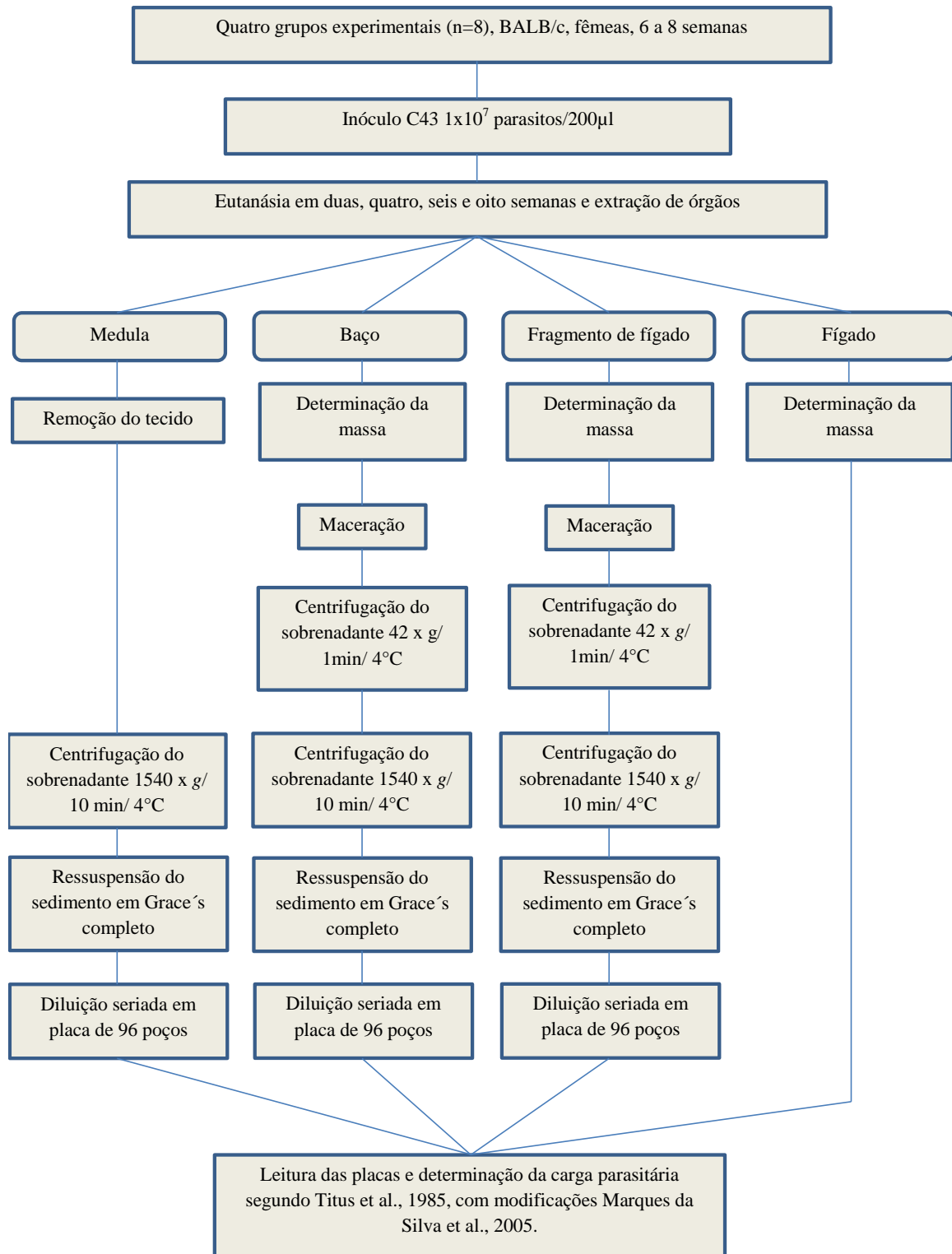
Com o intuito de manter a cepa C43, os parasitos foram cultivados em *Grace's Insect Medium* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – LGC, Cotia, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) 100U/mL de penicilina G (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), pH 6,5 (Grace's completo), à temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Para a obtenção da curva de crescimento da cepa C43, iniciou-se nova cultura com 1×10^5 parasitos/mL, mantidas as mesmas condições anteriores, e esta foi quantificada diariamente, em câmara de Neubauer após diluição em formalina 4% pelo período de 10 dias.

5.3 - Tropismo tecidual dos parasitos da cepa C43

A fim de avaliar o tropismo dos parasitos da cepa C43, fêmeas de camundongos BALB/c, com idade entre 6 a 8 semanas, divididas em quatro grupos experimentais (n=8 em dois experimentos independentes) foram inoculadas com 1×10^7 promastigotas do parasito. Para isso, preparou-se o inóculo a partir de uma cultura de parasitos em início de fase estacionária. Os parasitos foram coletados por centrifugação ($1540 \times g$ por 10 min a 4°C) e lavados três vezes em tampão fosfato (PBS). Para o preparo do inóculo na concentração de 1×10^7 parasitos/200 μL , a

quantidade de parasitos foi estimada em câmara de Neubauer. Os animais foram contidos e os parasitos inoculados por via intravenosa na veia da cauda, obtendo-se assim a infecção experimental. A aquisição e manutenção dos animais deram-se através do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP) onde, após a infecção, os animais foram mantidos no setor de experimentação em isogênicos, alojados 4 a 4 em gaiolas, mantidos em temperatura entre 21 e 25°C em ciclo de claro e escuro e água e ração *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical duas, quatro, seis e oito semanas após a realização do inóculo e a carga parasitária no fígado, baço e medula óssea avaliada pelo método de diluição limitante (TITUS *et al.*, 1985) com modificações (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005). Assim, em cada um dos tempos definidos, após a eutanásia, os animais foram submergidos em álcool etílico 70° (v:v) por 2 min. Sob condições assépticas, os animais, postos em decúbito dorsal, tiveram sua cavidade abdominal aberta com auxílio de tesoura cirúrgica. Um fragmento do fígado, o baço e uma das patas traseiras foram coletados de cada animal. Os fragmentos do fígado e os baços assim obtidos tiveram suas massas determinadas e permaneceram em banho de gelo imersos em Meio de Lavagem pH 7,2 constituído por DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 1% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina e 100 U/mL de penicilina G. A porção restante do fígado foi coletada para determinação da massa total do órgão. Os fragmentos de fígado e os baços foram então macerados, individualmente, com o auxílio de um macerador de órgãos (Pyrex® 2 mL *TenBroeck homogenizer with pour spout*) e o sobrenadante de maceração coletado em tubo cônico de 15 mL. O volume total de 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 de cada animal e imergiu-se os ossos em álcool etílico 70° (v:v) por 2 min, seguido por imersão em Meio de Lavagem. Foram cortadas as duas epífises e injetou-se Meio de Lavagem pelas extremidades, até completa remoção do tecido. Os materiais resultantes do processamento de baços, 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 completo. 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 completo. 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. Os procedimentos adotados para a realização deste trabalho encontram-se em conformidade com os princípios éticos estabelecidos pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal. A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP aprovou a realização desta etapa do trabalho sob protocolo n°. 135/2011.

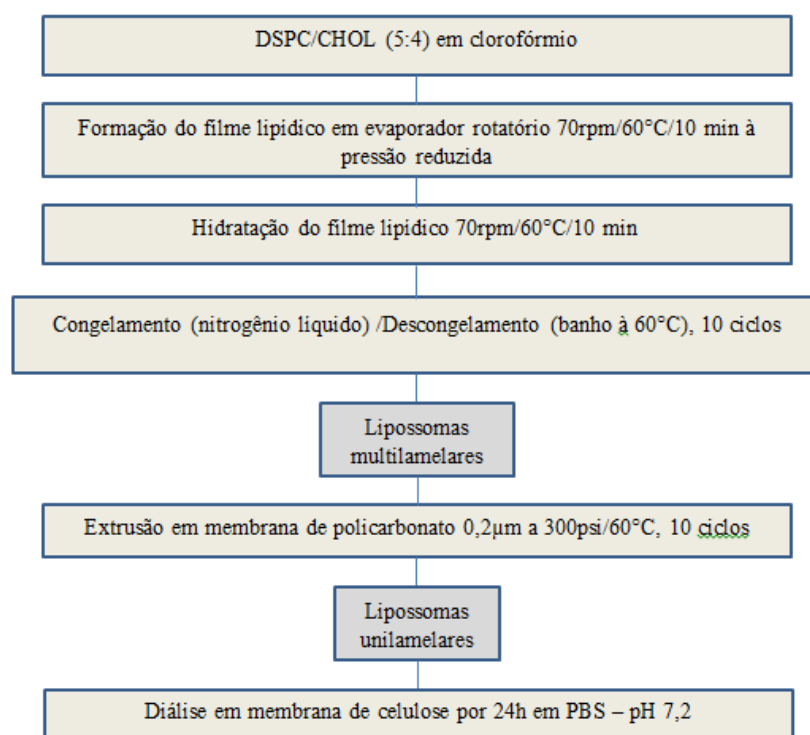
Figura 5: Delineamento experimental I. Diagrama referente ao experimento de determinação do tropismo tecidual da cepa C43 de *L. infantum* para o estabelecimento do delineamento experimental deste trabalho



5.4 – Preparo dos lipossomas

Os lipossomas utilizados para a realização deste trabalho foram compostos pelos lípidios distearoilfosfatidilcolina (DSPC) – Sigma, USA - e colesterol (CHOL) - Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). A proporção adotada de DSPC/CHOL (5:4) perfazendo 120,0 g/L, permitiu a obtenção de lipossomas unilamelares conforme metodologia de congelamento/descongelamento (MAYER; HOPE, 1985) com subsequente extrusão (NAYAR; HOPE; CULLIS, 1989). Solubilizaram-se os lípidios em clorofórmio e transferiu-se a solução para um balão de vidro. A formação do filme lipídico ocorreu pela evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório a 70 rpm/60°C/10 min à pressão reduzida. A hidratação do filme lipídico, em evaporador rotatório 70 rpm/60°C/10 min, com PBS pH 7,2 ou solução de tártaro emético (80,0g/L), isosmótica em relação ao plasma, resultou em lipossomas multilamelares vazios e de tártaro emético, respectivamente. A fim de se favorecer a encapsulação da substância ativa, procederam-se 10 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho a 60°C). Filtrou-se a solução de lipossomas multilamelares através de membrana de policarbonato 0,2 µm sobre pressão 250 psi/60°C em extrusora. A solução de lipossomas unilamelares assim obtida permaneceu em diálise em PBS - pH 7,2, em membrana de celulose por 24h, sendo o PBS substituído a cada 12h. Alíquotas antes e depois da diálise foram separadas para determinação de eficiência de encapsulação do princípio ativo.

Figura 6: Preparação dos lipossomas. Diagrama referente ao procedimento de preparação dos lipossomas convencionais vazios e de SbIII pelo método de congelamento e descongelamento seguido de extrusão.



5.5 – Determinação da eficiência de encapsulação

A espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP/OES) foi utilizada para a determinação da eficiência de encapsulação apresentada pelos lipossomas de antimônio trivalente, através de método validado para quantificação do analito, em matriz lipossomal peguilada, por nosso grupo de pesquisa (REIS, 2011). A revalidação do método para matriz lipossomal convencional permitiu a quantificação do metal para a formulação proposta (LÍCIO, 2013– em andamento). A eficiência de encapsulação foi dada pela razão entre as concentrações obtidas pelas dosagens da formulação pós e pré-diálise, respectivamente, de acordo com a equação:

$$EE\% = \left(\frac{\text{concentração de SbIII nos lipossomas}}{\text{concentração total de SbIII}} \right) \times 100$$

As amostras foram preparadas em balões volumétricos garantindo-se assim a precisão das diluições. Para que os lipossomas fossem rompidos, 500 µl de metanol foram adicionados a cada diluição 1:10 (v:v) das amostras ensaiadas. O suporte técnico e metodológico foi fornecido pelo Laboratório de Geoquímica – LGqA no Departamento de Geologia – DEGEO, onde as leituras foram realizadas no espectrômetro ótico CiroS CCD (Spectro) com plasma indutivamente acoplado (ICP/OES).

5.6 – Tamanho e índice de polidispersão

O índice de polidispersão e tamanho das vesículas foram avaliados usando a técnica de espectroscopia de correlação de fótons em aparelho Nanosizer N5 (Beckman Coulter, EUA). Para tanto, as preparações contendo SbIII ou PBS foram diluídas na proporção de 1:250 em água ultrapura de acordo com as especificações do aparelho. As aferições de distribuição de tamanho e índice de polidispersão da população foram avaliadas efetuando-se leituras de 3 amostras independentes em quintuplicata para formulações brancas e de SbIII.

5.7 – Liberação *in vitro* de antimônio lipossomal

Para avaliar o perfil de liberação do SbIII do interior das vesículas lipossomais, procedeu-se a diluição de alíquotas da formulação de lipossomas na proporção 1:10 em PBS (pH 7,2) e estas foram mantidas a 37°C sob agitação constante. Nos tempos de 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas, alíquotas foram transferidas para ultra filtros de celulose (Amicon® Ultra-0,5; 50,000 NMWL) e submetidas à centrifugação (12000 rpm por 20 minutos). Ao fim deste procedimento obtiveram-se duas frações, uma retida sobre o filtro e outra filtrada, caracterizadas por lipossomas de SbIII e SbIII liberado pelas formulações, respectivamente. As frações coletadas (filtrada e retida), nos diferentes tempos, foram submetidas à dosagem de SbIII por ICP/OES, conforme metodologia descrita no item 4.5. A diferença entre as concentrações de SbIII da preparação inicial e a concentração final permitiu estabelecer o perfil de liberação *in vitro* do SbIII dos lipossomas.

5.8 – Avaliação da estabilidade da formulação de lipossomas

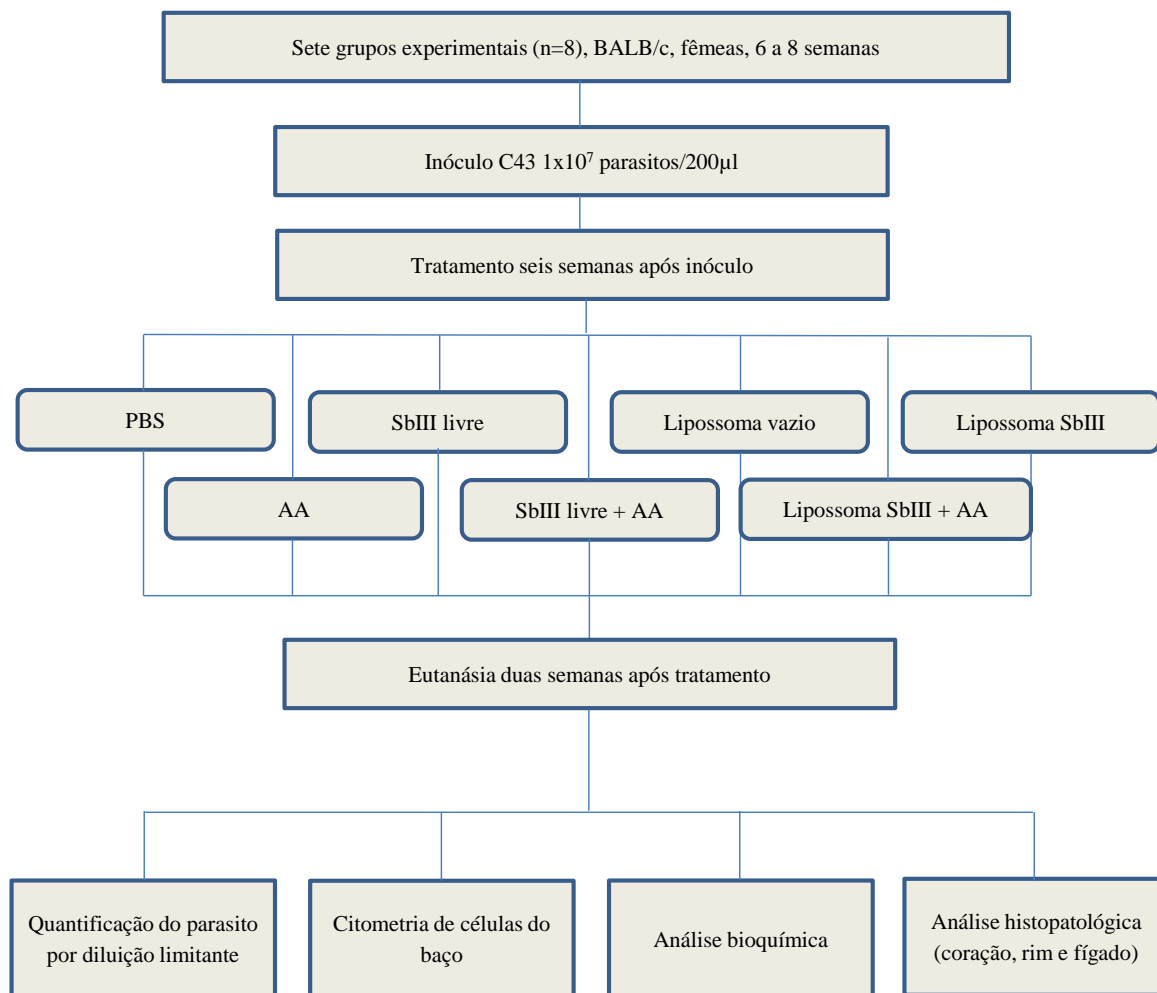
Para estabelecer o percentual de SbIII liberado do interior dos lipossomas em condições de armazenamento estabelecidas e em função do tempo, armazenou-se a formulação lipossomal de SbIII em geladeira (4 a 8°C) pelo período de 30 dias. Após 3, 7, 15, 21 e 30 dias transferiu-se alíquotas da formulação de SbIII para ultrafiltros de celulose (Amicon® Ultra-0,5; 50,000 NMWL) as quais foram submetidas à centrifugação (12000 rpm por 20 minutos). Obtiveram-se assim duas frações da alíquota, uma retida sobre o filtro constituída por lipossomas de SbIII e outra filtrada caracterizada por SbIII liberado das vesículas, as quais foram submetidas a dosagens de SbIII por ICP/OES, conforme metodologia descrita no item 4.5. Calculou-se a porcentagem de liberação de SbIII dos lipossomas nos diferentes tempos estabelecidos conforme a equação:

$$\% \text{Liberação} = \left(\frac{\text{concentração de SbIII na preparação armazenada}}{\text{concentração de SbIII na preparação inicial}} \right) \times 100$$

5.9 - Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico

Para avaliar a atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico, utilizou-se camundongos BALB/c, fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas, divididos em 7 grupos experimentais (n=8 em dois experimentos independentes). Os animais foram inoculados com a cepa C43 de *L. infantum* conforme descrito no item 4.3. Seis semanas após o inóculo, trataram-se os animais com: (1) PBS; (2) antimônio trivalente (SbIII) – 9 mgSb/kg ; (3) lipossomas vazios; (4) lipossomas de antimônio trivalente – 9 mgSb/kg; (5) ácido ascórbico (AA) – 300 mg/kg; (6) associação do ácido ascórbico – 300 mg/kg ao antimônio trivalente – 9 mgSb/kg e (7) associação da ácido ascórbico – 300 mg/kg aos lipossomas de antimônio trivalente – 9 mgSb/kg. Eutanasiou-se os animais por overdose de anestésico (cloridrato de cetamina 10% -*Syntec*- a 24,0 mg/Kg e cloridrato de xilazina 2,3% -*Sespo Indústria e Comércio/LTDA*- a 12,0 mg/Kg). A quantificação dos parasitos seguiu os mesmos procedimentos adotados no item 4.3. Durante a realização do experimento, os animais foram mantidos no setor de experimentação em isogênicos do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP), alojados 4 a 4 em gaiolas específicas para camundongos, mantidos em temperatura entre 21 e 25°C e água e ração *ad libitum*. Esta fase do trabalho seguiu as normas estipuladas pela CEUA/UFOP, protocolo n°. 25/2011, estando de acordo com o Código Brasileiro de Experimentação Animal.

Figura 7: Esquema representativo da avaliação da atividade leishmanicida e toxicidade acarretada pelos diversos tratamentos. Delineamento experimental referente aos experimentos de avaliação da atividade leishmanicida e toxicidade desencadeada pelos diversos tratamentos administrados aos camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*.



5.10 – Avaliação e análise do fenótipo das células do baço por citometria de fluxo, após administração das formulações propostas em animais infectados por *L. infantum*

A citometria de fluxo foi utilizada para quantificar as populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ bem como de linfócitos B e macrófagos presentes no baço. Além disso, foi avaliado o perfil de ativação dos macrófagos pela expressão das moléculas de MHC II e CD86. Neste contexto, para a imunofenotipagem *ex vivo* dos esplenócitos foram utilizados anticorpos monoclonais específicos

anti-receptores de células murinas, sendo estes: anti-CD3, CD4, CD8 (para avaliação do fenótipo das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺), anti-CD19 (para avaliação de linfócitos B), anti-F4/80, MHC II e CD86 (para avaliação fenotípica e ativação de macrófagos) (Tabela 2).

Para a imunofenotipagem *ex vivo*, o baço de cada animal foi retirado e o procedimento foi realizado utilizando-se os quatro quintos das células do baço resultantes da maceração, como descrito no item 4.3 dos materiais e métodos. Dessa forma, 1 x 10⁶ células foram previamente incubadas com 1,5 µL de anticorpo anti receptores para a porção Fc de IgG (CD16 e CD32) com o objetivo de bloquear a ligação não específica neste receptor. Após 5 min de incubação, os esplenócitos foram transferidos para tubos de poliestireno contendo 20µL de cada um dos anticorpos previamente diluídos contra os seguintes marcadores celulares: anti -CD3, CD4 e CD8 (Tubo1), CD19 (Tubo 2) e F4/80/MHCII/CD86 (Tubo 3). Posteriormente, os tubos foram incubados por 30 min, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a lavagem das células em PBS e os tubos foram centrifugados por 210 x g / 4°C / 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células foram lavadas como descrito anteriormente. Posteriormente, as células foram fixadas por adição de 200µL de solução fixadora - MFF (paraformaldeído 10 g/L, cacodilato de sódio 1%, cloreto de sódio 6,67 g/L em pH 7,2). A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCaliburTM, através do programa BD CellQuestTM Pro. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA), como mostra as figuras 8, 9 e 10.

Tabela 2: Anticorpos utilizados para a avaliação imunofenotípica das células de baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos.

Anticorpo Anti	Fluorocromo	Clone	Catálogo	Fabricante
CD3 ε	PE	145-2C11	100308	Bio Legend
CD4 (L3T4)	FITC	RM4-5	11-0042-82	Bioscience
CD8 a (Ly-2)	PerCP-Cy5.5	53-6.7	45-0081-82	Bioscience
CD19	FITC		RM-7701	Invitrogen
CD86 (B7-2)	PE	GL1	12-0862-82	Bioscience
F4/80	FITC	BM8	123107	Bio Legend
MHC II (I-A/I-E)	PE-Cy 5	M5/114.15.2	15-5321-82	Bioscience

Figura 8: Estratégia de análise da subpopulação de linfócitos T. A - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) versus granulosidade. B - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando fluorescência 2 (CD3/PE) versus granulosidade da população selecionada na janela do gráfico A. C - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 3 (CD8/PercP) versus fluorescência 1 (CD4/FITC) da população Q3 do gráfico B.

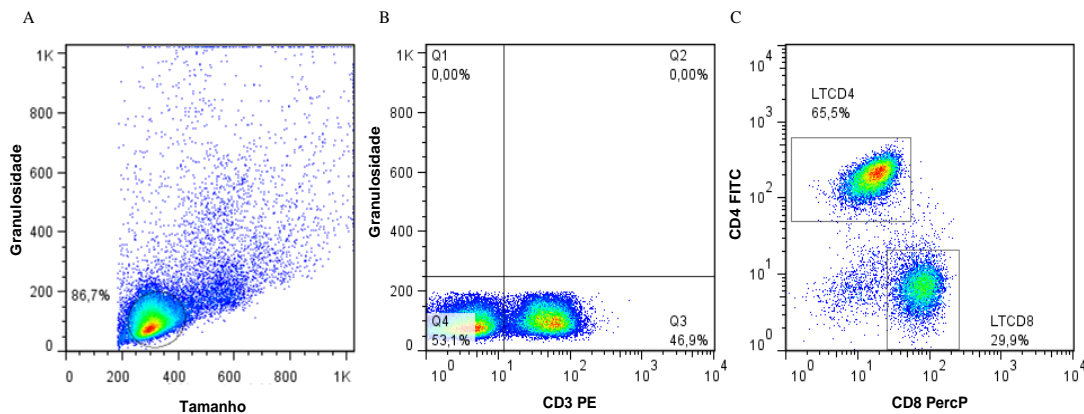


Figura 9: Estratégia de análise da subpopulação de linfócitos B. A - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) versus granulosidade. B - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando fluorescência 1 (CD19/FITC) versus granulosidade da população selecionada na janela do gráfico A.

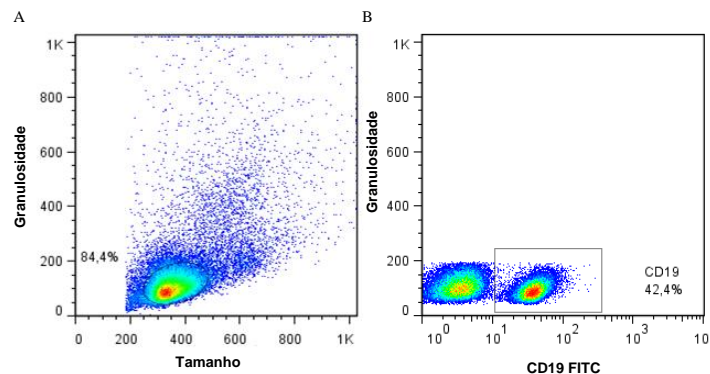
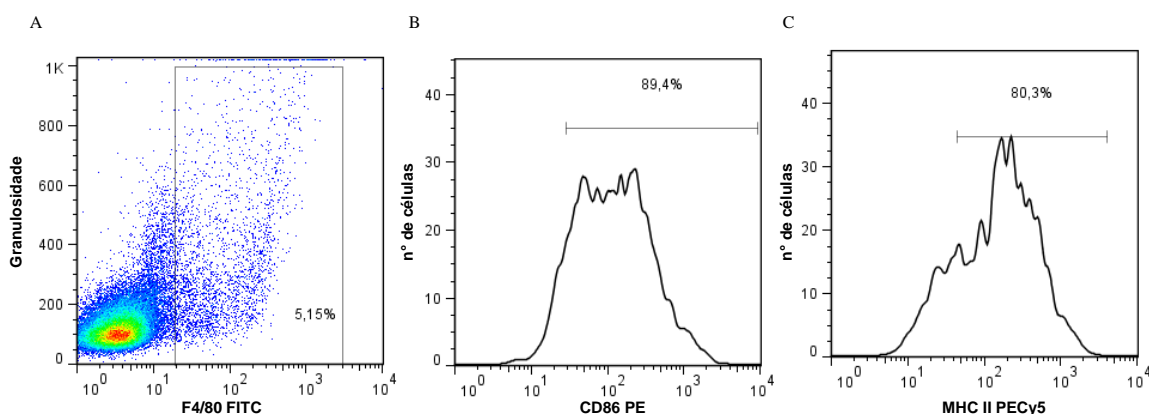


Figura 10: Estratégia de análise da população de macrófagos. A – Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando fluorescência 1 (F4/80/FITC) versus granulosidade. B - Gráfico “histograma” da intensidade de fluorescência 2 (CD86/PE) da população selecionada na janela do gráfico A. C - Gráfico “histograma” da intensidade de fluorescência 3 (MHC II/PE Cy5) da população selecionada na janela do gráfico A.



5.11 – Análises bioquímicas:

Por ocasião da eutanásia dos animais conforme descrito no item 4.9, retirou-se sangue por punção cardíaca. Após a retração do coágulo, o sangue 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 posteriores análises bioquímicas.

Os reagentes utilizados foram gentilmente cedidos pela *Bioclin – Quibasa*, através do programa “Bioclin nos Laboratórios Científicos”. Realizaram-se testes de função renal: creatinina; função hepática: aspartato cetoglutarato aminotransferase (TGO) e alanina cetoglutarato aminotransferase (TGP) e função cardíaca: aspartato cetoglutarato aminotransferase (TGO) e creatinoquinase isoenzima MB (CK-MB).

Os testes foram realizados em colaboração com o Prof.: 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 (Controle Normal – Biocontrol N K073 – Bioclin; Controle Patológico Biocontrol P K074 – Bioclin; Calibrador – Biocal K072 – Bioclin).

5.11 – Análises histopatológicas:

Após o procedimento de eutanásia, coleta de sangue e retirada de órgãos para a quantificação de parasitos, coletou-se o coração, rins e o fígado. Os órgãos assim obtidos foram fixados em formol tamponado 10% por um período de 48h. Fragmentos desses tecidos medindo 1cm² foram processados rotineiramente por meio do processador automático de tecidos LUPETEC® MODELO PT05.

Após o processamento, os órgãos foram incluídos em parafina à 60°C, submetidos à microtomia em cortes de 5µm e corados com hematoxilina-eosina (HE). Os cortes corados, assim obtidos, foram fixados entre lâmina e lamínula para que finalmente pudessem ser analisados. Conforme testes de coloração anteriormente realizados, adotaram-se como período de imersão em

cada um dos corantes o tempo para coloração de hematoxilina/eosina para coração 30 /30s, para o fígado 60/40s e para os rins 50/50s.

As imagens foram digitalizadas no Laboratório de Multiusuários NUPEB/UFOP com o auxílio do microscópio óptico de captura Leica[®] DM5000 através do software *Leica Application Suite* (versão 2.4.1).

5.12 – Análises estatísticas

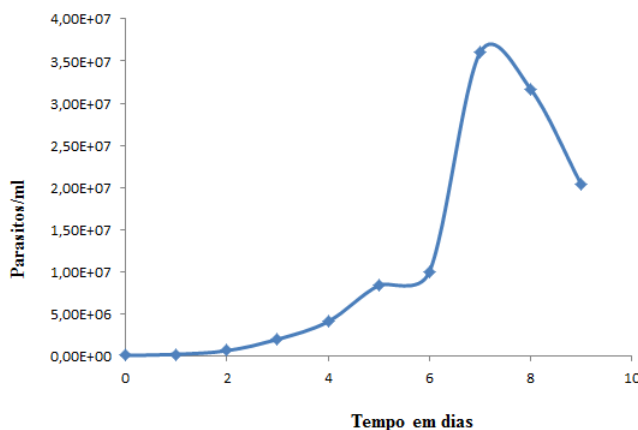
Realizaram-se as análises estatísticas com o auxílio do software GraphPad Prism 5. Inicialmente, todas as amostras avaliadas foram submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostinho-Person e Shapiro-Wilk. As amostras que apresentaram distribuição normal foram analisadas por ANOVA one way seguidas por teste de Turke's. Quando as amostras não seguiram distribuição normal foram analisadas Kruskal-Wallis seguidas por teste de Dunn's. Adotou-se como diferença estatística valores de p inferiores a 0,05.

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Curva de crescimento da cepa C43

Para a utilização da cepa C43 de *L. infantum* na realização deste trabalho, fez-se necessário a realização de uma curva de crescimento do parasito. Esta cepa, após seu isolamento e caracterização, foi mantida em meio LIT (*liver infusion tryptone*) no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) - Cipharma – Universidade Federal de Ouro Preto. Como seu cultivo passou a ser realizado em meio Grace´s completo, estabeleceu-se uma nova curva de crescimento. A figura 11 representa as sucessivas contagens de parasitos em câmara de Neubauer pós-diluição suficiente para a realização de contagem segura. Verificou-se que a fase estacionária iniciava-se no sétimo dia para os parasitos da cepa C43 postos em cultura na concentração de 1×10^5 parasitos/mL em meio Grace´s completo.

Figura 11: Curva de crescimento *in vitro* dos parasitos da cepa C43 de *L. infantum* cultivada em meio Grace´s completo.



6.2 - Tropismo tecidual dos parasitos da cepa C43

A fim de avaliar o tropismo dos parasitos da cepa C43 para os diferentes órgãos, e dessa forma determinar o tempo ideal para a realização do experimento, fêmeas de camundongos BALB/c, com idade entre 6 e 8 semanas, divididos em quatro grupos experimentais (n=8) em dois

experimentos independentes, foram inoculadas com 1×10^7 promastigotas do parasito. Cada um dos grupos experimentais foi eutanasiados em 2, 4, 6 e 8 semanas para avaliação da carga parasitária no fígado, baço e medula óssea. A realização deste experimento fez-se necessária em função da discordância encontrada na literatura entre os tempos de infecção e eutanásia adotados e a ausência desses dados em relação à cepa utilizada na realização deste trabalho. Por se tratar de uma cepa isolada de cão sintomático, os dados referentes a seu comportamento em modelo murino foram de suma importância para o estabelecimento do delineamento experimental.

Experimentos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa em camundongo BALB/c adotaram infectados com *L. chagasi* (cepa MHOM/BR/1974/M2682), adotaram um tempo de eutanásia dos animais de 28 dias, tempo no qual se verificou um pico de carga parasitária no fígado dos animais em experimentação (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005). O mesmo tempo de eutanásia foi adotado por Serafim e colaboradores (2010) em experimentos de avaliação da desnutrição proteica, ainda com esta cepa, em nosso grupo de pesquisa. Experimentos utilizando preparações lipossomais para o tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. chagasi* divergem entre si nos tempos de tratamento e eutanásia. Banerjee, De e Ali (2011), realizaram o tratamento com 8 semanas de infecção e a eutanásia 4 semanas após o tratamento. No mesmo modelo experimental, Tempone, Andrade e Heitor (2008) adotaram como tempo de tratamento 7 dias após a infecção e o de eutanásia como 14 dias após o tratamento. Em experimentos realizados em camundongos NMR1 infectados com *L. donovani* e tratados com lipossomas de antimônio trivalente, New e colaboradores (1978) adotaram como tempo de tratamento 10 dias após a infecção e eutanásia 2 dias após o tratamento. Quando lipossomas de antimônio foram utilizados no tratamento de *L. donovani* em modelo hamster, o tempo de tratamento adotado foi de 17 – 24 dias de infecção e o de eutanásia como de 32 dias pós tratamento (ALVING *et al.*, 1978; 1984a).

Carrión e colaboradores (2006) avaliaram a dependência da progressão da infecção em relação à concentração do inóculo camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*. Para tanto, avaliaram-se inóculos nas concentrações de 1×10^3 , 1×10^5 e 1×10^6 em períodos de infecção distintos de 7, 14, 28 e 56 dias. Concluiu-se que o estabelecimento da infecção e suas características dependerão da concentração do inóculo, entretanto, independentemente desta os camundongos BALB/c apresentam durante a progressão da infecção hepatoesplenomegalia, sendo esta pronunciada nos grupos infectados com 1×10^6 parasitos. Após 56 dias da infecção (8 semanas), apenas para os camundongos infectados com 1×10^6 parasitos, puderam ser detectados parasitos no fígado dos animais. No mesmo tempo, no baço, houve um aumento da carga parasitária em duas ordens de magnitude. No estabelecimento da infecção da medula óssea, apenas na infecção com

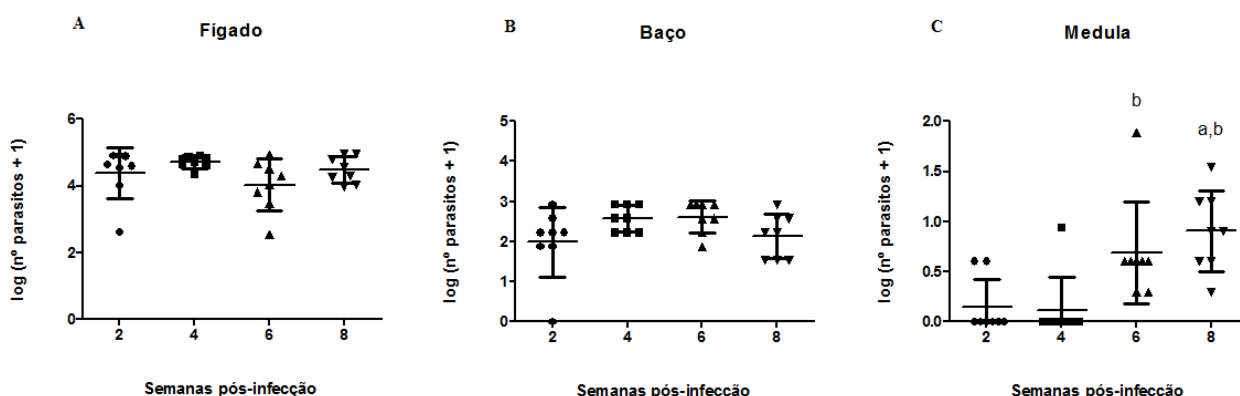
inóculo de 1×10^6 parasitos a infecção foi persistente durante as 8 semanas, e sua presença pode servir como um marcador de proteção relacionado a testes vacinais e de substâncias ativas leishmanicidas.

No presente trabalho, a infecção experimental foi realizada por veia da cauda com inóculo de 1×10^7 parasitos por animal, como adotada anteriormente em outros estudos em nosso grupo de pesquisa. É sabido que a via intravenosa não mimetiza a infecção natural promovida pelo inseto vetor, entretanto, durante a infecção natural a entrada do parasito resulta de uma administração dos mesmos por via intravenosa e intradérmica simultaneamente (NIETO *et al*, 2011). Usualmente, as infecções experimentais são realizadas com altas doses de parasitos, por via intravenosa, apesar de baixas concentrações de inóculo por via intradérmica apresentar-se como a forma de infecção que mais próximo mimetize a infecção natural (AHMED *et al*, 2003).

Com o intuito de avaliar se o tratamento proposto seria capaz de reduzir a carga parasitária nos diferentes órgãos parasitados em casos de LV e especialmente atingir a medula óssea pela administração do SbIII em formulação lipossomal convencional, o conhecimento do período no qual a infecção neste órgão está instalada é de suma importância. Simultaneamente, é importante que o parasitismo continue presente em altos níveis no baço e fígado para, dessa forma, poder-se avaliar a atividade da formulação em todos os órgãos infectados.

Os resultados deste experimento mostraram não haver diferença estatística na carga parasitária no fígado e baço em 2, 4, 6 e 8 semanas de infecção. Com relação à carga parasitária na medula, nota-se diferença estatística em 6 e 8 semanas, com maior carga parasitária na medula óssea em 8 semanas de infecção (figura 12).

Figura 12: Carga parasitária do fígado, baço e medula óssea de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*. (A) Carga parasitária no fígado expressa em $\log (n^{\circ}\text{parasitos}+1) / \text{órgão}$. (B) Carga parasitária no baço dada por $\log (n^{\circ}\text{parasitos}+1) / \text{órgão}$. (C) Carga parasitária na medula óssea dada por $\log (n^{\circ}\text{parasitos}+1) / \text{órgão}$. Os resultados estão representados como mediana \pm diferença interquartil. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação a: (a) 2 semanas de infecção e (b) 4 semanas de infecção.



Assim, tendo em vista os perfis de carga parasitária em baço, fígado e medula óssea apresentados, um período de avaliação da carga parasitária após 2 semanas do tratamento em única dose e observando-se o bom estado geral dos animais em experimentação, decidiu-se adotar como o tempo final do experimento 8 semanas após a infecção.

6.3 - Determinação da eficiência de encapsulação

O método de preparação lipossomal utilizado neste trabalho permitiu uma eficiência de encapsulação de SbIII em média 15%, como representado na tabela 3.

Tabela 3: Dosagem de antimônio trivalente em amostras de lipossomas convencionais.

Amostra	Concentração pré-diálise (mg/mL)	Concentração pós-diálise mg/mL	Eficiência de encapsulação
1	27,70	4,178	15,08%
2	28,17	4,096	14,54%
3	29,44	4,407	14,97%

Os resultados obtidos mostraram a viabilidade do método de encapsulação para a obtenção de uma formulação apropriada ao tratamento dos animais em experimentação. A concentração final de SbIII permitiu que a formulação lipossomal de SbIII pudesse ser administrada em um volume médio de 100 μ L de volume médio por animal. Dessa maneira, nos casos onde se realizou a coadministração de AA, o volume total de administração pela via IP não superou os 350 μ L permitidos para esta via.

A eficiência de encapsulação pode variar dependendo do tamanho dos lipossomas, do peso molecular das moléculas encapsuladas, composição lipídica das vesículas e procedimento de preparação dessas (MONNARD; OBERHOLZER; LUISI, 1997). Em se tratando do método de preparação dos lipossomas de antimônio, a eficiência de encapsulação pode variar de 8 – 50% (FRÉZARD; DEMICHELI, 2011d). Schettini e colaboradores (2003) obtiveram eficiência de encapsulação de 38% em lipossomas de SbV pelo método de liofilização; o mesmo grupo de pesquisa utilizando açúcar como crioprotetor no processo de preparação dos lipossomas, obteve eficiência de encapsulação com variação de 31 – 47% (SCHETTINI *et al.*, 2006a; RIBEIRO *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2011).

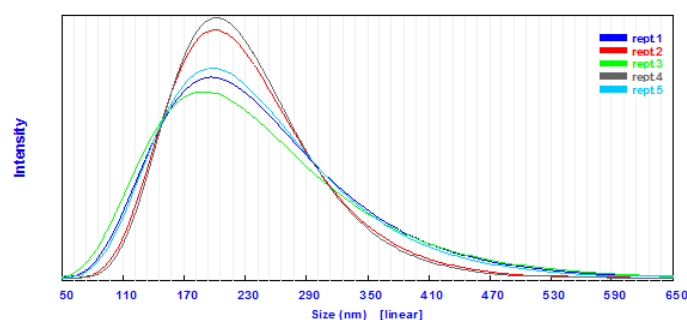
6.4 - Tamanho e índice de polidispersão

O índice de polidispersão (IP) e tamanho das vesículas, avaliados utilizando a técnica de espectroscopia de correlação de fótons, das formulações lipossomais de SbIII e PBS forneceram os valores de diâmetro médio das vesículas lipídicas e a distribuição do tamanho da população (tabela 4, figura 13). Os valores obtidos confirmam que a extrusão da formulação de lipossomas multilamelares através de membrana de policarbonato de 0,2 μ m sobre pressão 250 psi/60°C pode ser considerada como uma técnica confiável para a calibração do tamanho dos lipossomas. O baixo índice de polidispersão obtido após a extrusão indica homogeneidade de tamanho das partículas. As amostras em questão são consideradas monodispersas, uma vez que seu IP é inferior a 0,3 (HUNTER; FRISKEN, 1998).

Tabela 4: Diâmetro médio e índice de polidispersão da população de lipossomas de três preparações independentes analisadas em quintuplicata. Valores expressos em média \pm DP.

Amostra	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão
Lipossomas Vazios	228,1 \pm 8,37	0,198 \pm 0,041
	228,9 \pm 23,37	0,176 \pm 0,081
	217,4 \pm 3,26	0,109 \pm 0,051
Lipossomas de SbIII	207,2 \pm 7,68	0,061 \pm 0,037
	206,8 \pm 0,96	0,062 \pm 0,021
	198,0 \pm 1,80	0,071 \pm 0,030

Figura 13: Representação gráfica do diâmetro médio e índice de polidispersão referente à amostra 3 de lipossomas de SbIII.



6.5 – Liberação *in vitro* de antimônio lipossomal

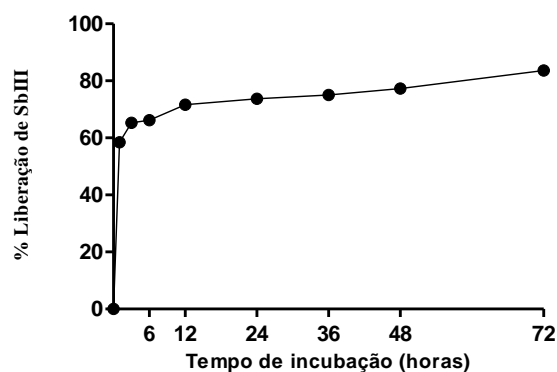
Para a análise do perfil de liberação *in vitro* do SbIII das vesículas lipossomais, os experimentos foram realizados em condições fisiológicas modelo com fator de diluição 1:10 (v:v) em PBS pH 7,2, temperatura 37°C e agitação constante, visando a manutenção de condições *sink*. Após a centrifugação do material nos diferentes tempos, as frações coletadas (filtrada e retida) foram submetidas à dosagem de SbIII por ICP/OES fornecendo valores de liberação em função do tempo conforme a tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Parâmetros indicadores da liberação do antimônio trivalente dos lipossomas a 37°C.

Tempo de incubação (horas)	Concentração (mg/mL)	% liberação
0	4,41	-
1,0	1,84	58,47
3,0	1,54	65,28
6,0	1,50	66,19
12,0	1,26	71,64
24,0	1,17	73,68
36,0	1,11	75,04
48,0	1,01	77,31
72,0	0,73	83,66

A cinética de liberação do SbIII, em função do tempo, nos ensaios *in vitro*, pode ser considerada bifásica. Uma rápida liberação do princípio ativo é apresentada em 1 a 6h, caracterizando o efeito “burst”, seguida por uma fase de liberação constante pelo período de 12 a 48h. A cada 12h, aproximadamente, 2% do antimônio trivalente foi liberado das vesículas lipossomais (figura 14).

Figura 14: Gráfico de liberação do SbIII encapsulado em lipossomas convencionais em função do tempo a 37°C.



A cinética de liberação do princípio ativo de uma substância encapsulada no compartimento aquoso interno dos lipossomas é regida pelo equilíbrio termodinâmico, sendo que a

evolução de estado do sistema levará à liberação do princípio ativo para o meio externo até que se atinja um equilíbrio (FRÉZARD *et al.*, 2005b). Os fosfolipídios presentes na bicamada lipídica são os responsáveis pelo nível de fluidez da membrana da vesícula. Assim, os que apresentam temperatura de transição de fase inferior à do meio em estudo promovem a formação de uma membrana na fase cristal-líquido ou fluida, em contrapartida, os que apresentam T_t superior à do meio estudado apresentam-se em fase gel ou rígida (FRÉZARD *et al.*, 2005b).

Os lipossomas utilizados na realização deste trabalho foram preparados com DSPC/CHOL na proporção 5:4. O DSPC utilizado na composição dos lipossomas utilizados neste trabalho possui T_t de 55°C, o que caracteriza lipossomas rígidos. A adição do colesterol permitiu reduzir a rigidez e conseqüentemente aumentar a fluidez da membrana lipossomal. A formulação assim obtida favoreceu a rápida liberação do SbIII pelos lipossomas ainda nas primeiras horas do teste de liberação *in vitro*.

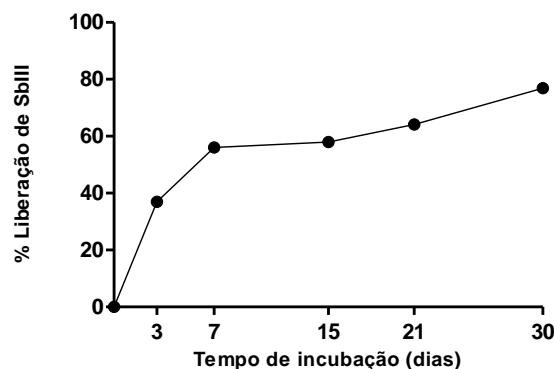
6.6 - Avaliação da estabilidade da formulação de lipossomas

Com o intuito de estabelecer o percentual de SbIII liberado pelos lipossomas em condições de armazenamento e em função do tempo, armazenou-se a formulação lipossomal de SbIII em geladeira (4 a 8°C) por um período de 30 dias. Após a centrifugação do material em dias estabelecidos, as frações coletadas (filtrada e retida) foram submetidas à dosagem de SbIII por ICP/OES. Os cálculos foram efetuados fornecendo valores de liberação em função do tempo (tabela 6, figura 15).

Tabela 6: Liberação de medicamento a partir da formulação de lipossomas contendo SbIII durante o período de 30 dias.

Tempo de armazenamento (dias)	Concentração (mg/mL)	% de liberação
0	4,407	-
3	2,78	36,95
7	1,94	56,07
15	1,86	57,98
21	1,59	64,09
30	1,03	76,87

Figura 15: Gráfico de liberação do SbIII encapsulado em lipossomas convencionais em função do tempo a 2-8°C por um período de 30 dias.



O armazenamento de lipossomas na forma de suspensão aquosa é, muitas vezes, incompatível com a estabilidade requerida para produtos farmacêuticos (FRÉZARD *et al.*, 2005b). No caso do SbIII encapsulado no compartimento aquoso do lipossoma, a criação de um gradiente de concentração da substância faz com que a membrana lipossomal atue como uma barreira. Entretanto, esse sistema evoluirá espontaneamente para um equilíbrio termodinâmico onde as concentrações de SbIII dentro e fora da vesícula estarão em equilíbrio.

A formulação proposta pode ser considerada pouco estável uma vez que, quando armazenada em geladeira, após 7 dias verificou-se que 50% do SbIII havia sido liberado para o exterior das vesículas. No entanto, para este trabalho, a característica em questão não foi considerada um problema para o tratamento proposto, uma vez que a administração em dose única foi realizada com a formulação recém-preparada quando esta apresentava eficiência de encapsulação de 100%.

6.7 - Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico

A avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico foi realizada pelo tratamento de fêmeas de camundongos BALB/c (n=8, em dois experimentos independentes), infectados por *L. infantum* e tratados com: (1) PBS; (2) antimônio trivalente (SbIII) – 9 mgSb/kg ; (3) lipossomas vazios; (4) lipossomas de antimônio trivalente – 9 mgSb/kg; (5) ácido ascórbico – 300 mg/kg; (6) associação do ácido ascórbico – 300 mg/kg ao antimônio trivalente – 9 mgSb/kg e (7) associação do

ácido ascórbico – 300 mg/kg à lipossomas de antimônio trivalente – 9 mgSb/kg. Adotou-se a via intraperitoneal para o tratamento considerando-se estudos que indicam o aumento da concentração local do fármaco por período prolongado como uma vantagem para tratamentos administrados por esta via (BAJAJ; YEO, 2010). Além disso, a administração de lipossomas por via IP promove a absorção dos mesmos pela via linfática, independente do tamanho das formulações (HIRANO; HUNT, 1985). Experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa compararam o efeito da administração de lipossomas de SbV por via intravenosa (IV) e intraperitoneal no tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. chagasi*. Os resultados mostraram que as duas vias apresentam o mesmo efeito sobre a carga parasitária. O tratamento por via IP apresentou a vantagem de reduzir a formação de granulomas e a área de deposição de colágeno do tipo I e III no fígado em comparação à via IV (MARCON, 2011). Desta forma, optou-se por fazer a administração dos tratamentos pela via IP por esta apresentar como benefícios: (1) fácil manuseio dos animais em experimentação; (2) alta concentração do fármaco na cavidade intraperitoneal e (3) boa absorção através da via linfática.

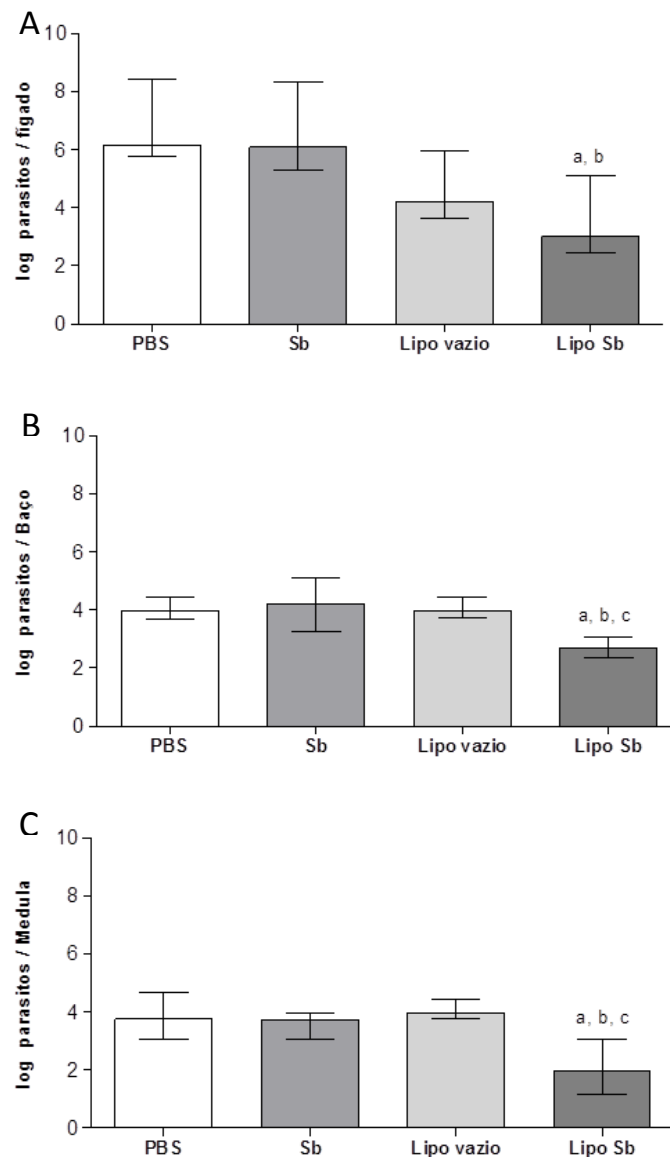
Para maior compreensão dos resultados, os mesmos serão apresentados e discutidos em dois blocos: (1) avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulações lipossomais convencionais e (2) avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulações lipossomais convencionais, associado ao ácido ascórbico.

6.7.1 - Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional

A análise da carga parasitária no baço, fígado e medula óssea dos animais em experimentação demonstrou que, em todos os órgãos analisados, houve redução da carga parasitária apenas nos animais tratados com a formulação lipossomal de SbIII na concentração de 9 mgSb/Kg (figura 16). A redução da carga parasitária no fígado em decorrência da administração da formulação lipossomal foi de aproximadamente 47% em relação ao grupo controle PBS. Para o baço, a redução da carga parasitária com o mesmo tratamento ficou em torno de 33% em relação ao controle. Com relação à medula óssea, a redução da carga parasitária coincide com a obtida pela mesma formulação no fígado, aproximadamente 47%. O tratamento com SbIII livre na mesma concentração utilizada para o tratamento com a formulação lipossomal (9 mgSb/Kg) não foi capaz de reduzir a carga parasitária em nenhum dos órgãos avaliados. Resultados similares foram obtidos

pela administração de lipossomas de SbV em cão, o que acarretou redução significativa na carga parasitária nos diversos órgãos analisados e, assim como neste trabalho, a administração de SbV livre não teve efeito sobre a carga parasitária (SCHETTINI *et al.*, 2006a; RIBEIRO *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2011). A formulação de lipossomas vazios utilizada neste trabalho não foi capaz de promover a redução da carga parasitária no baço, fígado ou medula óssea. Lipossomas pequenos, com diâmetro inferior a 200 nm parecem ter acesso facilitado à medula óssea (FRÉZARD *et al.*, 2005b). Schettini e colaboradores (2006a) demonstraram a influência do tamanho das vesículas de lipossomas de SbV na vetorização do fármaco para a medula óssea. Nesse estudo, a concentração de SbV na medula óssea de cães apresentou-se três vezes maior para a preparação de lipossomas de menor diâmetro (410 nm) em relação à de tamanho maior (1200 nm), sugerindo que lipossomas de tamanho reduzido promovem uma efetiva vetorização para a medula óssea. A redução da carga parasitária na medula óssea induzida pela formulação de SbIII proposta neste trabalho pode ser explicada pela vetorização eficiente do fármaco para este órgão, uma vez que o tamanho da formulação foi em média 205 nm. Tomados em conjunto, os dados apresentados demonstram a real capacidade da formulação proposta em vetorizar o SbIII para os órgãos alvo analisados, em especial a medula óssea.

Figura 16: Avaliação da carga parasitária de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Fígado. (B) Baço. (C) Medula óssea. (PBS) tampão fosfato, (Sb) Antimônio trivalente livre, (Lipo vazio) Lipossomas convencionais vazios, (Lipo Sb) Lipossomas convencionais de SbIII. Carga parasitária nos diferentes órgãos expressa em log parasitos/órgão. (n=4 por grupo experimental). Os resultados estão representados como mediana ± diferença interquartil. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação a: (a) PBS, (b) Sb e (c) Lipo vazio. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes).



A liberação do SbIII a partir dos lipossomas depende da captura das vesículas pelas células do SFM. Esse processo é favorecido pelo processo de opsonização que ocorre assim que os lipossomas entram em contato com os componentes do sangue (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c). Após a fagocitose, os lipossomas são degradados pelas fosfolipases lisossomais e o SbIII liberado nos fagolisossomas pode ser excretado para o meio extracelular ou difundir-se pelo citosol. O SbIII entra então em contato com as formas amastigotas do parasito ocasionando morte celular pela formação de complexos estáveis com tióis (SUN; YAN; CHENG, 2000;

FRÉZARD *et al.*, 2001a), inibição da TR (CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 1995; WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004) e ligação às proteínas *zinc finger* com consequente dano celular irreversível (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c).

A velocidade de liberação do princípio ativo do interior dos lipossomas é dependente do tamanho dos lipossomas e da composição da membrana. Assim, quanto menores as vesículas, menor será a fagocitose das mesmas pelas células do SFM e, conseqüentemente, maior o período de circulação. A composição da membrana lipossomal influencia a velocidade de degradação dos lipossomas, quanto menor a fluidez da membrana maior será a capacidade de retenção da substância encapsulada (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c). A depuração dos lipossomas depende da interação das vesículas com as lipoproteínas plasmáticas de alta densidade (HDL) e com as opsoninas. O HDL age nas vesículas por dois mecanismos, retirando lipídios de membrana ou acrescentando a elas apoproteínas, ocasionando a desestabilização e ruptura da estrutura dos lipossomas. As opsoninas aderem à membrana lipossomal facilitando a fagocitose por células do SFM e, conseqüentemente, diminuindo o tempo de circulação das vesículas (MACHADO; GNOATTO; KLUPPEL, 2007).

Como apresentado anteriormente, o tamanho dos lipossomas preparados e utilizados na realização deste trabalho atende à necessidade de vetorização não apenas para fígado e baço, mas também para a medula óssea como um importante avanço para a cura da LV. A composição da formulação de lipossomas convencionais adotada neste trabalho foi utilizada por nosso grupo de pesquisa no tratamento da esquistossomose (DE MELO *et al.*, 2003). Neste estudo, objetivou-se a comparação da ação esquistossomicida entre o tratamento com SbIII encapsulado em lipossomas convencionais e furtivos (de circulação prolongada). Tendo em vista a localização do verme causador da esquistossomose mansônica, um parasito extracelular residente no sistema porta, a preparação de circulação prolongada apresentou-se mais eficiente na redução do parasitismo. Em se tratando da *Leishmania*, parasito intracelular de células do SFM, o tratamento com lipossomas convencionais foi considerado, neste trabalho, como melhor sistema a ser empregado na vetorização de substâncias ativas leishmanicidas para os locais infectados.

Considerando-se que lipossomas na fase gel possuem menor capacidade de troca com as lipoproteínas mantendo uma elevada capacidade de retenção do princípio ativo (FRÉZARD *et al.*, 2005b), uma alteração na proporção DSPC/CHOL com a diminuição da concentração de colesterol poderia aumentar tanto a estabilidade quanto a retenção do SbIII na formulação proposta. O retardamento da liberação do antimônio lipossomal para um tempo acima de 3h possibilitaria que maior quantidade do princípio ativo atingisse as células do SFM. Estudos *in vitro* demonstram um

período de 3h como o necessário para que macrófagos possam fagocitar tanto promastigotas de *Leishmania* quanto lipossomas em meio de cultura (DEY *et al.*, 2000; AFRIN *et al.*, 2001; CARTER *et al.*, 2005). A melhora da estabilidade da formulação possibilitaria a proposição de um esquema terapêutico em doses múltiplas com aumento da biodisponibilidade do fármaco nos órgãos alvo e possível aumento da redução da carga parasitária.

6.7.2 - Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ao ácido ascórbico

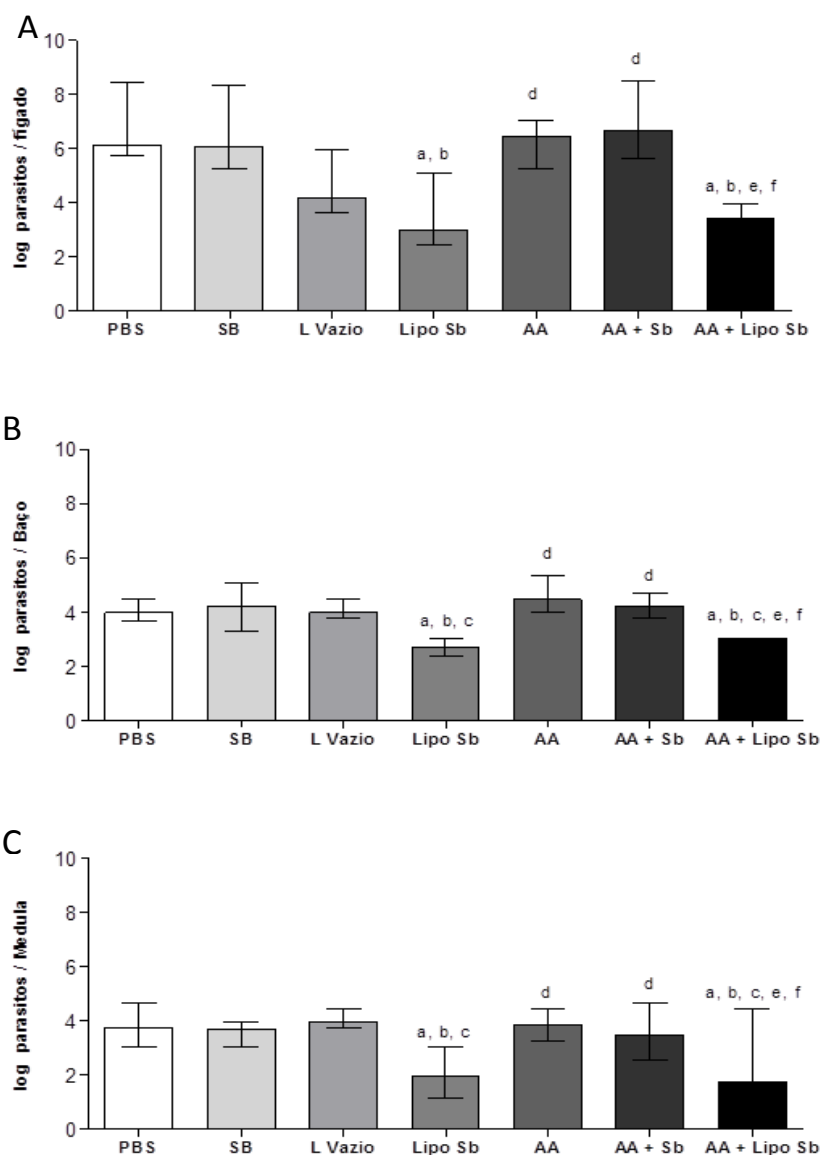
A avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal associado ao ácido ascórbico foi realizada no mesmo experimento do item 5.7.1.. Assim sendo, os resultados referentes à inter-relação dos grupos: (1) PBS; (2) SbIII livre; (3) Lipossoma vazio e (4) Lipossoma de SbIII apresentam-se como discutidos anteriormente:

- A análise da carga parasitária no baço, fígado e medula óssea dos animais em experimentação demonstrou que, em todos os órgãos analisados, houve redução da carga parasitária apenas nos animais tratados com a formulação lipossomal de SbIII na concentração de 9 mgSb/Kg.
- O tratamento com SbIII livre na mesma concentração utilizada para o tratamento com a formulação lipossomal (9 mgSb/Kg) não foi capaz de reduzir a carga parasitária em nenhum dos órgãos avaliados.
- A formulação de lipossomas vazios utilizada neste trabalho não foi capaz de promover a redução da carga parasitária no baço, fígado ou medula óssea.

Estudos de nosso grupo de pesquisa mostraram que lipossomas de longa circulação são capazes de reduzir os efeitos cardiotóxicos do SbIII mesmo quando este é administrado em altas doses (MACIEL *et al.*, 2010). A partir de então, tomando como base estudos de Bahlis e colaboradores (2002) indicando aumento da eficácia e redução da toxicidade no tratamento de pacientes leucêmicos através de associação de AA à terapia adotada (arsênio trivalente - AsIII), iniciaram-se os estudos da possível redução da toxicidade do SbIII pela administração concomitante ao AA. Assim, propôs-se que a associação do ácido ascórbico ao SbIII no tratamento da leishmaniose poderia reduzir os efeitos tóxicos induzidos por preparações de SbIII sem, contudo, prejudicar a ação leishmanicida causada pela administração do tratamento.

A análise da carga parasitária no baço, fígado e medula óssea dos animais em experimentação demonstrou que, em todos os órgãos analisados, a administração do AA não alterou a carga parasitária quando este foi coadministrado às formulações (figura 17). Não foram, portanto, observadas diferenças estatísticas ente os grupos PBS – AA; Sb – Sb + AA e Lipossomas Sb – Lipossoma Sb + AA.

Figura 17: Avaliação da carga parasitária de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos II. (A) Fígado. (B) Baço. (C) Medula óssea. (PBS) tampão fosfato, (Sb) antimônio trivalente, (Lipo vazio) lipossomas convencionais vazios, (Lipo Sb) lipossomas convencionais de antimônio trivalente, (AA) ácido ascórbico, (AA+Sb) associação de ácido ascórbico ao antimônio trivalente e (AA+Lipo Sb) associação de ácido ascórbico à lipossomas convencionais de antimônio trivalente. Carga parasitária nos diferentes órgãos expressa em log parasitos/órgão (n= 4, por grupo experimental). Os resultados estão representados como mediana ± diferença interquartil. Diferenças estatísticas (p<0,05) em relação a: (a) PBS, (b) Sb e (c) Lipo vazio, (d) Lipo Sb, (e) AA e (f) AA+Sb. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.



Iniciando os estudos sobre o tema em nosso grupo de pesquisa, Reis, 2010, realizou experimentos em ratos Wistar sobre a cardiotoxicidade do SbIII adotando um protocolo agudo com a administração da dose de 17mg de SbIII/kg e dose de AA de 650mg/kg. Este trabalho mostrou que lipossomas de longa circulação de SbIII associados ou não ao AA foram capazes de reduzir a cardiotoxicidade do SbIII.

O ácido ascórbico (AA) pode atuar tanto como agente oxidante quanto redutor, o que depende do estado redox celular e a concentração de ascorbato no tempo em questão. Quando o mesmo é oxidado no organismo, ocorre produção de dehidroascorbato com consequente formação de peróxido de hidrogênio e, em geral, a citotoxicidade induzida pelo AA é mediada pela formação deste complexo. O AA pode ser regenerado nos mamíferos pela redutase semi-deidroascorbato dependente de NADH, reação que depleta GSH, sendo mais vantajosa para a célula do que a síntese de novo e representando um ganho filogenético adaptativo dos mamíferos (DUCONGE *et al.*, 2008). A GSH forma complexos com íons de metais, com consequente formação de moléculas GS-M (glutathione – metal). O antimônio, assim como o arsênio, é classificado como um metalóide ou semimetal, o que explica sua ligação à GSH, desempenhando um importante papel em sua farmacologia. A estequiometria da reação GSH – SbIII é 3:1. Essa ligação é muito estável em condições fisiológicas pH 7,2 (condição na qual a GSH se encontra no citosol das células do hospedeiro) mas enfraquece quando o pH é diminuído (SUN; YAN; CHENG, 2000). Estudos utilizando arsênio sugerem que o mesmo induz apoptose por geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente o peróxido de hidrogênio. A GSH reduz o efeito apoptótico e inibe o crescimento das células tumorais pelo As₂O₃ por ser capaz tanto de processar o peróxido de hidrogênio quanto de reparar danos na membrana. A coadministração do AA aumenta a apoptose induzida por As₂O₃ em decorrência de sua oxidação resultar em altos níveis de H₂O₂, o que exerce ação direta na depleção da GSH citosólica (BACHLEITNER-HOFMANN *et al.*, 2001, BAHLLIS *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação do SbIII está relacionado à ligação do mesmo a grupos sulfidríla do parasito (ROBERTS; BERMAN; RAINEY, 1995). O SbIII inibe reversivelmente a TR, uma enzima chave intermediária na regulação da homeostase redox tiol, bem como na defesa contra produtos químicos e o stress oxidativo. Estudos implicam a ação da tripanotona e glutathione na desintoxicação de SbIII e de outros metais pesados por efluxo. As superexpressões de glutamylcisteína sintetase, ornitina descarboxilase e PgpA sendo as duas primeiras enzimas essenciais para os passos limitantes na biossíntese das enzimas GSH e espermidina e, a última um transportador metálico tiol intracelular, foram demonstradas como um importante papel na

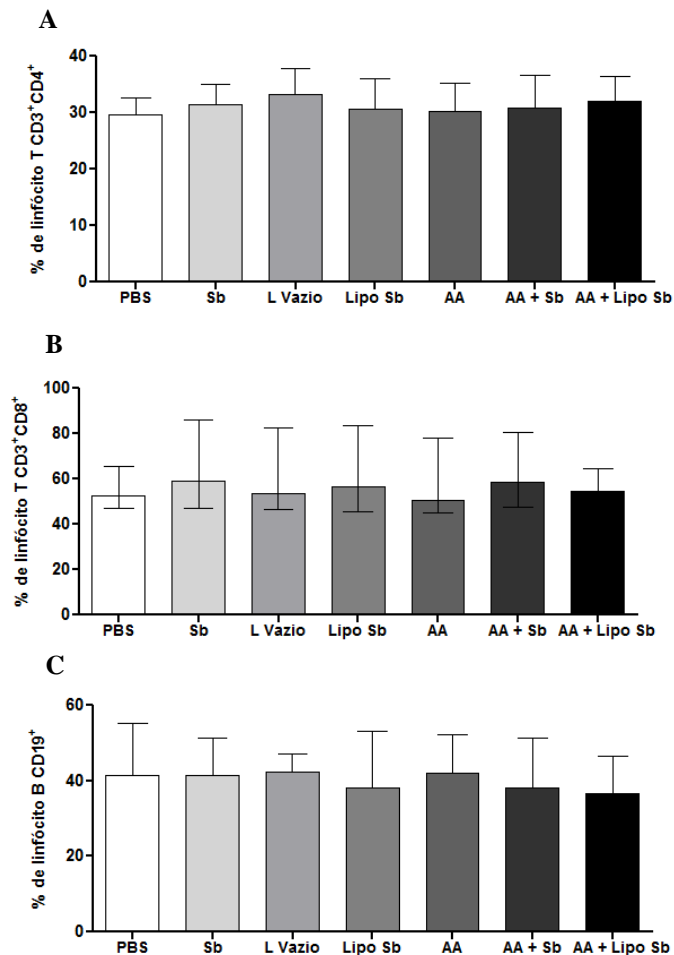
resistência do parasito ao Sb. Apesar de não se saber ao certo o mecanismo de ação do SbIII, acredita-se que este esteja intimamente ligado ao mecanismo de resistência. O SbIII atua, portanto, em duas vias, diminui a capacidade tamponante do tiol intracelular, promovendo a perda de tripanotona e glutatona e aumenta a concentração intracelular das formas de dissulfeto destes tióis através da inibição da tripanotona redutase, assim perturbando profundamente a potencial redox tiol da célula (WILLIE *et al.*, 2004)

A dualidade do mecanismo de ação do ácido ascórbico pode tanto ajudar na ação do SbIII, aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio e dessa maneira causando a morte dos parasitos, quanto prejudicar através da diminuição dessas espécies potencialmente tóxicas e interferindo na concentração intracelular de GSH nas células do hospedeiro. O fato de não ter havido diferenças estatísticas na ação leishmanicida pela administração concomitante do AA ao SbIII indica que possivelmente a primeira hipótese, acerca da ação do AA, seja a verdadeira.

6.8 - Determinação do perfil fenotípico das células do baço após administração das formulações propostas em animais infectados por *L. infantum*;

Considerando-se a importância do baço na resposta imune frente ao estímulo de parasitos e administração de formulações como anteriormente citadas, o presente trabalho avaliou quantitativamente as populações celulares de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos do baço, bem como o perfil de ativação celular dos macrófagos através da expressão dos marcadores fenotípicos CD86 e MHC II no contexto *ex vivo*. A análise dos dados demonstrou não haver diferença estatística no percentual de linfócitos T e B em resposta aos tratamentos administrados, independente do grupo experimental (Figura 18).

Figura 18: Perfil imunofenotípico, no contexto *ex vivo*, de células do baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Percentual de linfócitos TCD4⁺. (B) Percentual de linfócitos TCD8⁺. (C) Percentual de linfócitos B CD19⁺. (PBS) tampão fosfato, (Sb) antimônio trivalente, (Lipo vazio) lipossomas convencionais vazios, (Lipo Sb) lipossomas convencionais de antimônio trivalente, (AA) ácido ascórbico, (AA+Sb) associação de ácido ascórbico ao antimônio trivalente e (AA+Lipo Sb) associação de ácido ascórbico a lipossomas convencionais de antimônio trivalente. Os resultados estão representados em A e C como média ± SD e em B como mediana ± diferença interquartil.

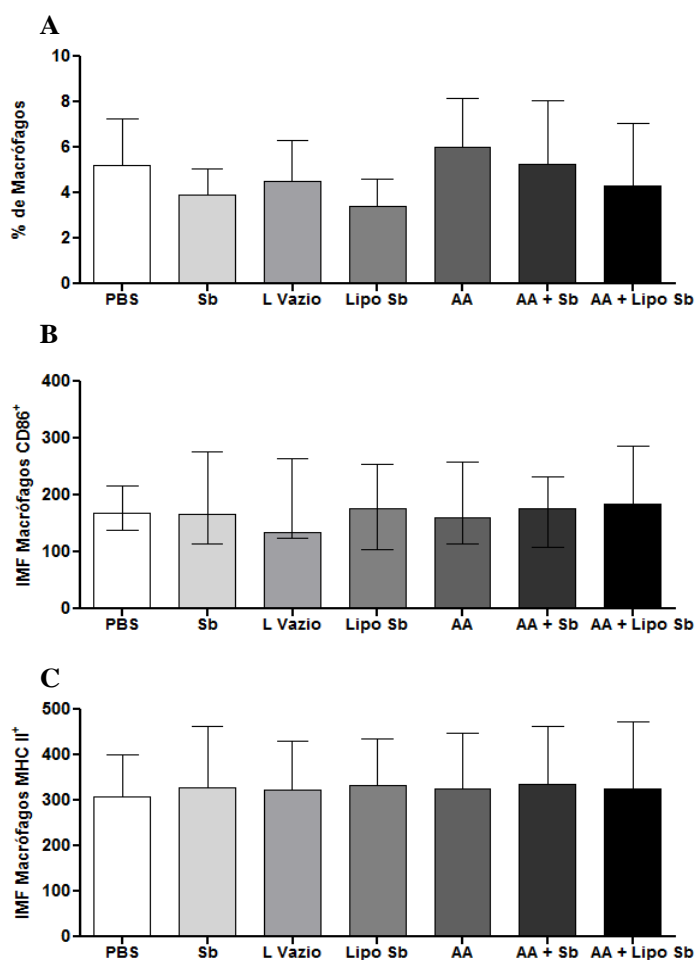


Após a infecção por *L. donovani*, células T CD4 e CD8 são ativadas gerando respostas Th1 e Th2. Neste contexto, os linfócitos TCD4 controlam a proliferação do parasito na fase inicial da infecção, enquanto os linfócitos TCD8 mantém o fígado livre de reinfecções na fase tardia (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Estudos em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* mostraram não haver diferença estatística entre as populações de Linfócitos T e B quando comparados os grupos infectado e controle, assim como não houve aumento nas populações de células T CD4 e CD8 (CARRIÓN *et al*, 2006).

De maneira similar foi avaliado, no contexto *ex vivo*, o percentual de macrófagos por fenotipagem através da marcação de F4/80, bem como o seu perfil de ativação celular através da expressão dos marcadores CD86 e MHC II nas células do baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* tratados conforme descrito anteriormente. A análise dos dados mostrou

não haver diferença estatística no percentual de macrófagos bem como no padrão de ativação celular (Figura 19).

Figura 19: Perfil da resposta imune em macrófagos, no contexto *ex vivo*, do baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Percentual de macrófagos F4/80⁺. (B) Intensidade média de fluorescência de macrófagos F4/80 e CD86. (C) Intensidade média de fluorescência de macrófagos F4/80 e MHC II. (PBS) tampão fosfato, (Sb) antimônio trivalente, (Lipo vazio) lipossomas convencionais vazios, (Lipo Sb) lipossomas convencionais de antimônio trivalente, (AA) ácido ascórbico, (AA+Sb) associação de ácido ascórbico ao antimônio trivalente e (AA+Lipo Sb) associação de ácido ascórbico à lipossomas convencionais de antimônio trivalente. Os resultados estão representados em A e C como média ± DS e em B como mediana ± diferença interquartil.



Sabe-se que, quando o baço é exposto a agentes imunomoduladores, mudanças celulares típicas podem ser desencadeadas e alterações no tamanho e densidade das populações da bainha linfóide periarteriolar e da zona marginal podem ser encontradas (Elmore, 2006). Quanto à polpa branca, a diminuição na celularidade da bainha linfóide periarteriolar ocorre quando um dano provoca necrose ou apoptose de células T após a exposição do organismo a estímulos como radiação, vírus ou fármacos. Embora menos frequente, a redução da população das células B

advindas da zona marginal também pode ser notada. O estímulo desencadeado por fármacos como Citral e androstenediona podem aumentar a celularidade da bainha linfóide periarteriolar. Da mesma forma, alterações na celularidade da polpa branca podem ser desencadeadas por uma resposta aguda a antígenos aumentando a quantidade de células B. De maneira semelhante, células B imaturas e imunoblastos podem proliferar em resposta a um antígeno (CESTA, 2006). Em relação à polpa vermelha, esta também pode ser avaliada por mudanças em sua população de linfócitos. Entretanto, embora a polpa vermelha possua populações de linfócitos e macrófagos, esta área do baço é predominantemente composta por células vermelhas (Elmore, 2006). Todavia, apesar de haver a presença de estímulos desencadeados pelos diversos tratamentos adotados na realização deste trabalho, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Apesar de os tratamentos terem reduzido a carga parasitária para este órgão, não houve a remoção completa dos parasitos. Os resultados podem ser explicados pela perda a microarquitetura esplênica, com conseqüente comprometimento da função deste órgão, impossibilitando a resposta imune celular.

6.9- Avaliação das funções hepática, cardíaca e renal em BALB/c infectados e submetidos a diferentes tratamentos.

A evolução dos casos de LV leva a um importante comprometimento do fígado, desencadeando alterações em sua arquitetura e subsequente comprometimento de suas funções nos diversos modelos estudados (GUTIERREZ; MAKSEM; REINER, 1984; GIUNCHETTI *et al*, 2007; MELO *et al*, 2009). A LV afeta diretamente órgãos ricos em células do SFM, como baço fígado, medula óssea e linfonodos (HERWALDT, 1999; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; CHAPPUIS *et al.*, 2007). O coração e os rins não são descritos na literatura como focos de parasitismo das espécies de *Leishmania*. Apesar disso, os fármacos utilizados no tratamento desta enfermidade entram em contato direto, quando na circulação sanguínea, com esses órgãos. Além disso, o antimônio apresenta excreção renal e em decorrência dessa característica a utilização desta medicação deve ser rigorosamente avaliada em pacientes com função renal comprometida ou em crianças, sob pena de comprometimento renal grave (ZAGHLOUL; AL-JASSER, 2004; CRUZ *et al*, 2007).

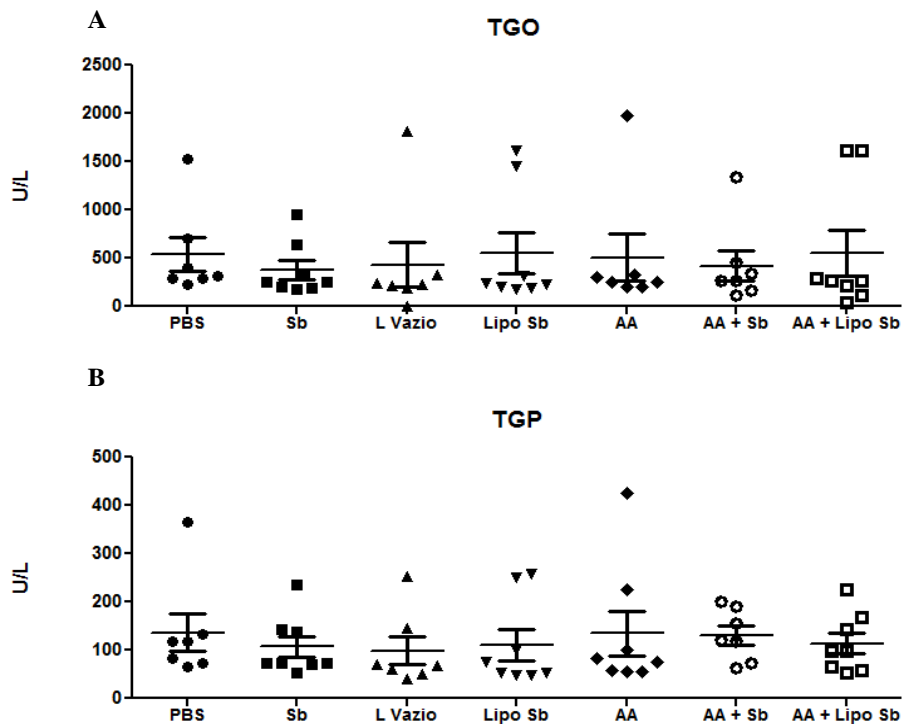
Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa observaram que, a utilização de antimônio trivalente livre em ratos Wistar, provoca alterações cardiovasculares detectáveis por eletrocardiograma, sendo as mesmas minimizadas quando este composto é administrado em

associação ao ácido ascórbico (REIS, 2010). Alterações cardíacas graves reveladas pela análise de eletrocardiogramas em pacientes tratados com antimoniais pentavalentes também são relatadas durante o tratamento de diversas formas de leishmaniose (CHULAY; SPENCER; MUGAMBI, 1985; ANTEZANA *et al*, 1992).

6.9.2 – Avaliação bioquímica da função hepática

Como relatado anteriormente a função hepática é normalmente avaliada pela concentração sérica de bilirrubinas, proteínas, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e aminotransferases. Neste trabalho optou-se por realizar esta avaliação através da quantificação dos níveis séricos das transaminases (TGO, TGP) devido ao pequeno volume de material biológico obtido para análise (200µL). Obtiveram-se como, valores de referência, concentrações séricas de TGO e TGP como $219,15 \pm 19,52$ U/L e $57,55 \pm 2,89$ U/L, respectivamente, estabelecidos por dosagens bioquímicas em BALB/c sadios, realizadas nas mesmas condições dos ensaios nas amostras dos grupos experimentais. A administração dos tratamentos propostos não foi capaz de induzir alterações significativas nos parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*.

Figura 20: Avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. Concentração sérica de A - asparto cetoglutarato aminotransferases (TGO) e B - alaninacetoglutarato aminotransferases (TGP). (PBS) tampão fosfato, (Sb) antimônio trivalente, (L vazio) lipossomas convencionais vazios, (Lipo Sb) lipossomas convencionais de antimônio trivalente, (AA) ácido ascórbico, (AA+Sb) associação de ácido ascórbico ao antimônio trivalente e (AA+Lipo Sb) associação de ácido ascórbico a lipossomas convencionais de antimônio trivalente. Concentração sérica de transaminases dada por U/L. Os resultados estão representados como mediana ± diferença interquartil. Não houveram diferenças estatísticas observáveis entre os grupos avaliados.



A avaliação da função hepática em ratos Wistar, tratados em protocolo subagudo em 30 dias com dose diária de SbIII e AA de 3,8 mgSb/kg e 15 mg/kg, respectivamente, realizada anteriormente por nosso grupo de pesquisa, não foi capaz de detectar alterações nos parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática. As concentrações séricas de TGO, TGP, albumina e proteínas totais nos animais avaliados não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com SbIII associado ou não ao AA. Apenas a fosfatase alcalina apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos controle e SbIII + AA (REIS, 2010).

Levando-se em consideração o comprometimento hepático desencadeado pela administração de antimoniais, o monitoramento das funções hepáticas como avaliação da resposta do paciente à medicação é corriqueiro. Em decorrência da ampla quantidade de dados gerados nas pesquisas clínicas, muitos são os pesquisadores que os discutem. Wortmann e colaboradores (2002) avaliaram 38 pacientes positivos para leishmaniose cutânea, os quais foram tratados com Pentostam[®] com 20 mg/kg/dia em dois protocolos: (1) 20 dias de tratamento e (2) 10 dias de tratamento seguidos de 10

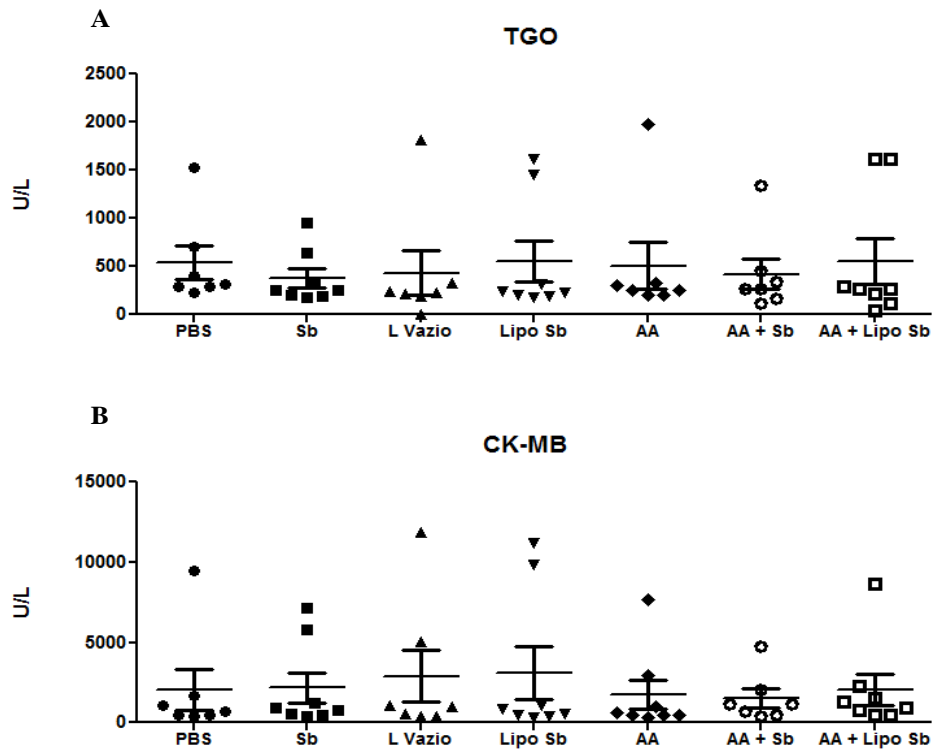
dias de infusão de dextrose 5%. Dos pacientes acompanhados 18% apresentaram pancreatite nos 10 primeiros dias de tratamento. Aumentos significativos nos níveis de amilase, lipase, aminotransferases e diminuição nos níveis de hematócrito, plaquetas e na contagem de leucócitos foram encontrados entre os grupos avaliados pronunciando-se nos tratamentos realizados em 20 dias. Andersen e colaboradores (2005) compararam o tratamento da leishmaniose cutânea quando esta foi tratada com pentamidina ou antimoniato de meglumina. Pacientes tratados com o antimoniato de meglumina apresentaram aumento na concentração sérica de TGO e lipase sem, contudo, haver alteração nas concentrações de TGP. Kashani e colaboradores (2007) avaliando a toxicidade decorrente da administração de antimoniato de meglumina, utilizando dosagem de 20 mg SbV/kg/dia durante 15 dias não observaram alterações bioquímicas na avaliação dos parâmetros hepáticos analisados aminotransferases, bilirrubinas e lipase.

6.9.3 – Avaliação bioquímica da função cardíaca

A preocupação com os pacientes infectados por *Leishmania* e tratados com antimoniais vai além do monitoramento das funções hepáticas. Importantes alterações cardíacas são notadas durante o tratamento com essa classe de medicamentos e o monitoramento das funções cardíacas é recomendado para os pacientes em tratamento com esses fármacos. A monitoração cardíaca deve ser realizada tanto antes quanto durante o tratamento, e este deve ser descontinuado caso os pacientes apresentem alterações cardiovasculares como arritmias ou prolongamento do intervalo QT superior a 500 milisegundos (SADEGHIAN; ZIAEI; SADEGHI, 2008; ZANONI *et al*, 2009).

Assim, como relatado anteriormente, devido ao baixo volume de material biológico (soro) obtido por ocasião da eutanásia dos animais em experimentação, optou-se por avaliar as funções cardíacas pelos níveis séricos de TGO e CK-MB. A concentração sérica CK-MB, obtida através da dosagem do soro de animais BALB/c sadios, realizada nas mesmas condições dos ensaios nas amostras dos grupos experimentais, estiveram situadas em $550,5 \pm 61,12$ U/L. Assim, como nas avaliações da função hepática, a administração dos tratamentos propostos não foi capaz de induzir alterações significativas nos parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade cardíaca, em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*.

Figura 21: Avaliação bioquímica da função cardíaca de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. Concentração sérica de A - asparto cetogluturato aminotransferases (TGO) e B - creatinoquinase fração MB (CK-MB). (PBS) tampão fosfato, (Sb) antimônio trivalente, (L vazio) lipossomas convencionais vazios, (Lipo Sb) lipossomas convencionais de antimônio trivalente, (AA) ácido ascórbico, (AA+Sb) associação de ácido ascórbico ao antimônio trivalente e (AA+Lipo Sb) associação de ácido ascórbico a lipossomas convencionais de antimônio trivalente. Concentração sérica de TGO e CK-MB nos diferentes órgãos dada por U/L. Os resultados estão representados como mediana \pm diferença interquartil. Não houveram diferenças estatísticas observáveis entre os grupos avaliados.



Assim como relatado anteriormente, a avaliação da toxicidade cardíaca do SbIII foi realizada por nosso grupo de pesquisa em ratos Wistar sob protocolo subagudo. A avaliação dos eletrocardiogramas (ECG) apresentou diferenças significativas nos parâmetros QT, QTc e QRS (intervalos entre as ondas eletrocardiográficas) dos animais tratados com SbIII livre quando comparado aos animais PBS (controle). A coadministração do AA ao SbIII reduziu significativamente a variação do intervalo QT quando esta associação foi comparada aos parâmetros obtidos pelo grupo SbIII, apesar de esta associação ainda apresentar diferenças significativas nos parâmetros intervalo QT e QTc. A análise dos parâmetros bioquímicos de lesão cardíaca não apresentou, no entanto, alterações significativas quanto às dosagens bioquímicas de CK-MB e TGO (REIS, 2010).

Em estudo anteriormente citado, apesar de Andersen e colaboradores (2005) haverem observado aumento na concentração sérica de TGO as avaliações dos ECG não apresentaram

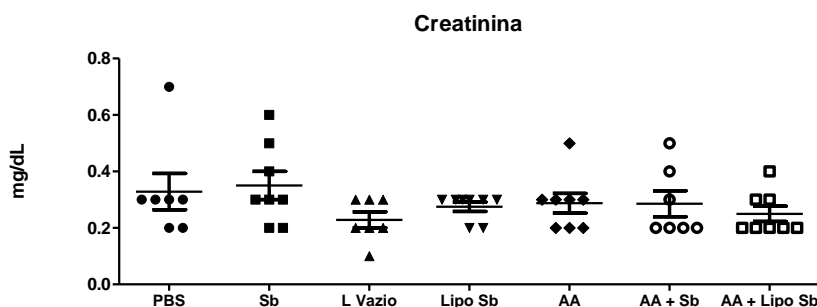
alterações. Apesar de a segurança do tratamento com as medicações a base de SbV estarem comprovadas, a avaliação eletrocardiográfica dos pacientes, antes e durante a administração da medicação, deve ser rigorosamente monitorada a fim de se descontinuar o tratamento em casos de prolongamento do intervalo QTc e arritmias importantes (LAWN *et al*, 2006).

6.9.1 – Avaliação bioquímica da função renal

O comprometimento da função renal é uma preocupação importante no tratamento da leishmaniose, visto que a depuração dos antimoniais, medicamentos de primeira escolha em grande parte das regiões endêmicas, dá-se por esta via. A creatinina é excretada na urina dos camundongos e sua concentração sérica, em camundongos BALB/c, apresenta-se em valores aproximados de $0,45 \pm 0,07$ mg/dL (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009). Camundongos BALB/c, adquiridos e mantidos nas mesmas condições dos animais em experimentação, apresentaram valores de creatinina de $0,25 \pm 0,06$ mg/dL em sua dosagem bioquímica realizada nas mesmas condições dos ensaios das amostras dos grupos experimentais.

Devido ao baixo volume de soro obtido dos camundongos BALB/c utilizados na realização do trabalho (200µL), optou-se por realizar a dosagem de creatinina como avaliação bioquímica da função renal. A administração dos tratamentos propostos não induziu alterações significativas no parâmetro bioquímico indicativo de toxicidade renal em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*.

Figura 22: Avaliação bioquímica da função renal de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. Concentração sérica de creatinina. (PBS) tampão fosfato, (Sb) antimônio trivalente, (L vazio) lipossomas convencionais vazios, (Lipo Sb) lipossomas convencionais de antimônio trivalente, (AA) ácido ascórbico, (AA+Sb) associação de ácido ascórbico ao antimônio trivalente e (AA+Lipo Sb) associação de ácido ascórbico a lipossomas convencionais de antimônio trivalente. Concentração sérica de creatinina nos diferentes órgãos dada por mg/dL. Os resultados estão representados como mediana \pm diferença interquartil. Não houveram diferenças estatísticas observáveis entre os grupos avaliados.



No estudo em ratos Wistar sob protocolo subagudo, a análise bioquímica da função renal dos grupos SbIII e SbIII + AA não apresentou alterações significativas nas concentrações séricas de creatinina, uréia e relação creatinina/uréia (REIS, 2010). Soto e colaboradores (2004), avaliaram a função renal de pacientes tratados com formulações de medicamentos a base de antimônio pentavalente para o tratamento de leishmaniose cutânea na dosagem de 20mg SbV/kg/dia. As dosagens bioquímicas de creatinina 10 dias após o início do tratamento e após o término do tratamento em 15 dias e 20 dias, não revelaram alterações importantes nesse parâmetro bioquímico.

6.10- Identificação das alterações histopatológicas nos tecidos hepático, cardíaco e renal induzidas pela administração das formulações propostas em animais infectados por *L. infantum*.

No intuito de avaliar o impacto da administração dos diversos tratamentos propostos nos tecidos hepático, cardíaco e renal de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*, fragmentos destes órgãos de todos os animais em experimentação foram coletados, processados, corados por hematoxilina e eosina (HE) e analisados. O impacto do parasitismo no tecido hepático deve-se à multiplicação do parasito nas células do SFM abundantes nesse órgão. A infecção por *Leishmania sp.* ocorre através da migração do parasito pela matriz extracelular, o que é facilitado pela ação da metaloprotease, leishmanolisina, responsável pela proteólise da fibronectina e do colágeno do tipo I. A fibronectina está envolvida na interação entre células, heparina, fibrina, colágeno e imunoglobulinas além mediar a interação dos parasitos com os macrófagos. A interação parasito matriz extracelular hepática resulta em modificações capazes de danificar a função hepática (MELO *et al*, 2009)

Os efeitos do antimônio no tecido cardíaco devem-se ao contato deste semimetal diretamente com o mesmo, enquanto as alterações no tecido renal decorrem da depuração dos antimoniais realizada neste órgão. A utilização de compostos de antimônio no tratamento de pacientes acometidos pela leishmaniose leva a importantes alterações cardiovasculares observáveis pela realização de ECG (LEITE *et al*, 2007; VIDAL *et al*, 2010). Ademais, considerações importantes têm sido realizadas acerca da administração de compostos de antimônio para o tratamento de leishmaniose em pacientes e modelos animais com função renal comprometida (HANTSON *et al*, 2000; ZAGHLOUL; AL-JASSER, 2004) .

A utilização de nanocarreadores para a administração de medicamentos à base de antimônio no tratamento da LV tem por base a rápida fagocitose destas estruturas por células do SFM

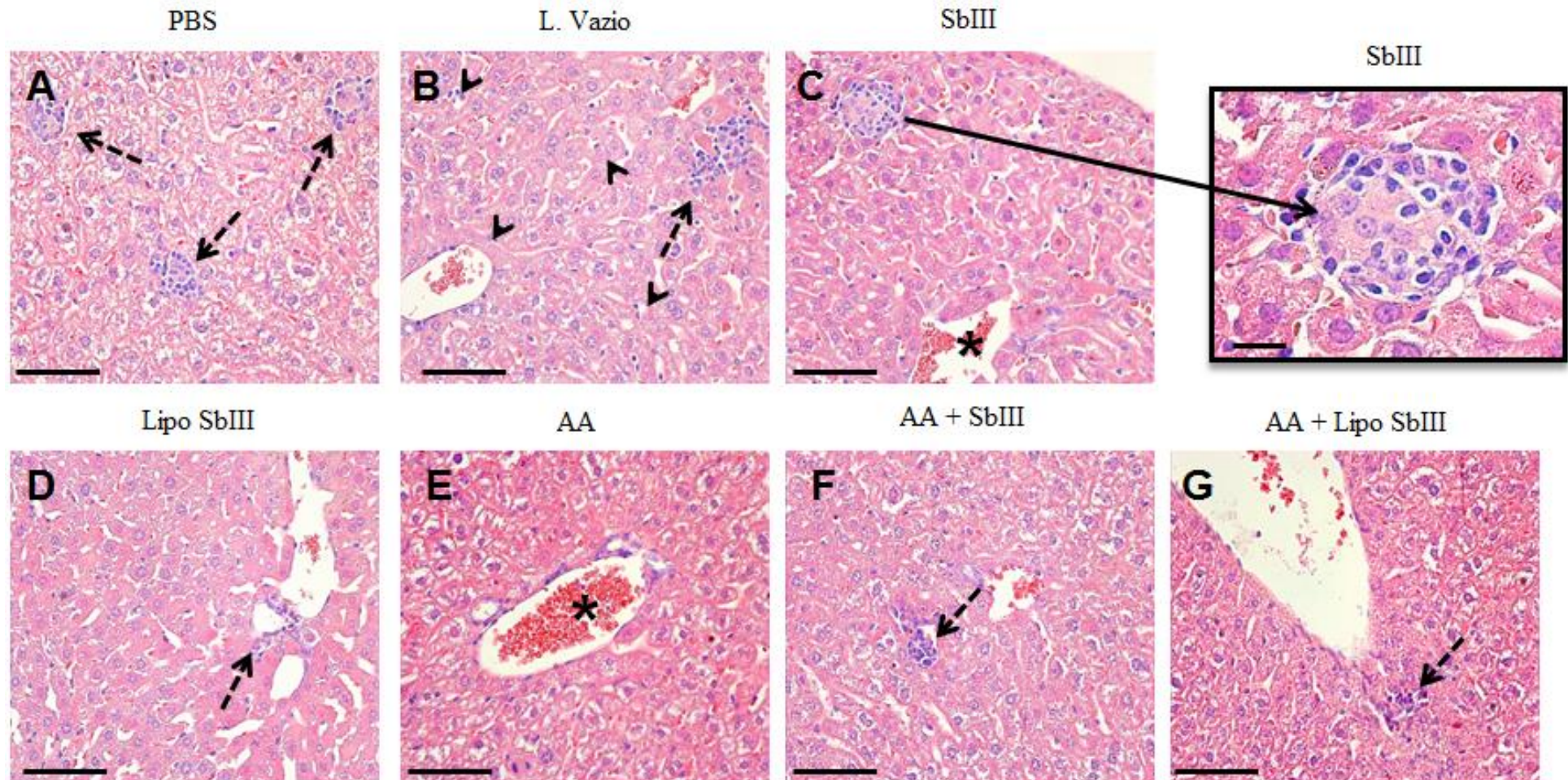
direcionando, assim, o medicamento para os focos de infecção do parasito. Neste trabalho, lipossomas foram utilizados objetivando aumentar a fagocitose por parte das células do SFM, reduzir o contato direto do SbIII com o tecido cardíaco e diminuir a dose do SbIII a ser administrada e, conseqüentemente, reduzir o impacto deste semimetal no tecido renal. A utilização do AA teve por objetivo reduzir o estado inflamatório geral dos animais permitindo, assim, a proteção dos tecidos afetados.

6.10.1 – Análises histopatológicas do tecido hepático

O comprometimento hepático na LV reflete a resposta espectral do hospedeiro à infecção. As lesões são de caráter inflamatório crônico cujo padrão morfológico é caracterizado por agregados de células mononucleares que, por vezes, esboçam aspecto granulomatoso. Com o objetivo de avaliar o impacto das formulações na infecção ou na regressão das lesões hepáticas causadas pela infecção por *L. infantum*, foram coletados fragmentos de fígado dos animais em experimentação. A análise histológica mostrou que os animais tratados com PBS, SbIII e lipossoma vazio exibiram padrão inflamatório granulomatoso típico, com exsudato de células que se organizavam em forma de agregados circunscritos de macrófagos e células epitelióides sendo classificados como granulomas imaturos (FIGURA 23). Também foram observados focos com infiltrado linfoplasmocitário intralobulares. Os espaços sinusoides apresentaram um aumento difuso das células de Kupffer que exibiam aspecto hipertrofiado (FIGURA 23). Alguns hepatócitos centrolobulares apresentaram moderado grau de degeneração hidrópica. As veias centrolobulares e os ramos da veia hepática nos espaços porta exibiam intensa hiperemia com moderado infiltrado mononuclear em ambos os compartimentos, caracterizando uma perivasculite (FIGURA 23). Nos grupos tratados com AA ou lipossoma de SbIII, apesar das alterações inflamatórias apresentarem as mesmas características dos grupos citados anteriormente, a intensidade da inflamação foi mais discreta com redução do número de granulomas.

Diferentemente dos demais grupos avaliados, a coadministração de AA junto a lipossomas de SbIII reduziu, de forma acentuada, o infiltrado inflamatório. Não foram observados granulomas. Os vasos apresentavam hiperemia discreta a ausente, sem alterações no número e tamanho das células de Kupffer nos espaços sinusóides (FIGURA 23).

Figura 23: Foto micrografias dos cortes histológicos (5µm, HE) representativos das alterações histopatológicas no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Tampão fosfato (PBS). (B) Lipossomas convencionais vazios (L vazio). (C) Antimônio trivalente (Sb). (D) Lipossomas convencionais de antimônio trivalente (Lipo Sb). (E) Ácido ascórbico (AA). (F) Associação de ácido ascórbico ao antimônio trivalente (AA+Sb). (G) associação de ácido ascórbico a lipossomas convencionais de antimônio trivalente (AA+Lipo Sb). Barra = 50 µm. Inserto = 25 µm. Seta pontilhada = acúmulos focais de células inflamatórias. Cabeça de seta = Células de Kupffer hipertrofiadas. * vasos hiperêmicos. O inserto representa granuloma imaturo.



Após a infecção pela veia da cauda, as formas promastigotas entram no fígado através da veia portal e infectam macrófagos e células dendríticas onde então se transformam em formas amastigotas e replicam-se avidamente. A partir daí, durante as primeiras duas semanas, a defesa do hospedeiro frente aos parasitos de *Leishmania* dependerá do sistema imune inato e os parasitos se multiplicarão, na ausência de IL-12 e células T ativadas. Após este período, linfócitos T *Leishmania*-específicos migram do baço para o fígado onde interagem com células parasitadas com consequente desenvolvimento de uma resposta Th1. Inicia-se, então, a formação dos granulomas. A arquitetura de um granuloma maduro no fígado é caracterizada por um centro constituído por células de Kupffer parasitadas, circunscritas por células mononucleares contendo monócitos e células T CD4 e CD8 (NIETO *et al*, 2011). A formação dos granulomas é, portanto, um processo dependente da produção de quimiocinas; recrutamento de monócitos, neutrófilos, células T CD4 e CD8; produção de citocina inflamatórias e ativação de células infectadas (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Carrión e colaboradores (2006) avaliaram as alterações histopatológicas no fígado de camundongos infectados com numero diferente de parasitos e estas foram visualizadas apenas nos animais inoculados com 10^5 e 10^6 parasitos sendo, portanto, dependentes da concentração do inóculo. Além disso, a eficiência leishmanicida das células de Kupffer parece estar relacionada com o estágio de maturação dos granulomas. Em se tratando de camundongos BALB/c a instalação da resistência hepática à *L. infantum* é dependente do desenvolvimento de granulomas e apenas granulomas maduros desenvolvem mecanismos leishmanicidas eficientes (NIETO *et al*, 2011).

Segundo Gutierrez, Maksem e Reiner (1984), a mudança marcante na histopatologia em camundongos BALB/c infectados por *L. donovani* é a formação de granulomas no fígado, baço e medula óssea. De acordo este estudo, descrevem-se as alterações encontradas no fígado em oito semanas como a presença de 70% de granulomas maduros, redução no número de parasitos intracelulares, presença de fibroblastos e células mononucleadas na periferia e deposição de colágeno.

A infecção por *L. donovani* em cães apresenta alta frequência de inflamação portal e da cápsula e esta inflamação é estimulada pelo parasitismo, provavelmente em uma reação do organismo para sequestrar o parasito na intenção de controlar a multiplicação das amastigotas, não sendo, no entanto, suficiente para debelar a infecção. As células de Kupffer apresentam-se hipertróficas e hiperplásicas e predominam em animais sintomáticos. A presença do parasito é, portanto, suficiente para desencadear o processo inflamatório (GIUNCHETTI *et al*, 2007).

Melo e colaboradores (2009) caracterizaram as alterações hepáticas em cães infectados por *L. chagasi*. Análises histopatológicas em material corado por HE identificaram inflamação crônica envolvendo toda a arquitetura do fígado. O espaço portal não apresentou fibrose, mas um pequeno infiltrado constituído por linfócitos, células plasmáticas e macrófagos. Entre os animais infectados, 95% apresentou uma reação inflamatória granulomatosa crônica caracterizada pela formação de numerosos granulomas intralobulares de tamanhos variados constituídos de macrófagos parasitados ou não, algumas células epitelióides, poucos linfócitos, células plasmáticas e raros neutrófilos. As células de Kupffer apresentavam hiperplasia e hipertrofia e estavam em sua maioria parasitadas.

No presente trabalho, pôde-se observar que nos grupos tratados com PBS e lipossomas vazios, usados como grupos controle, são compatíveis com as alterações hepáticas arquiteturais esperadas em decorrência da infecção por espécies de *Leishmania* causadoras de LV. Os animais tratados com SbIII livre, (composto leishmanicida), também não apresentaram alterações nas características deste órgão. Dessa forma, este grupo experimental apresentou características semelhantes aos grupos controle. Isso pode ser explicado pela baixa dose utilizada, uma vez que, como mostrado anteriormente, não houve redução significativa da carga parasitária após o tratamento com SbIII na dose de 9mgSbIII/kg. O grupo tratado com AA apresentou redução do processo inflamatório, uma vez que esse composto é amplamente descrito por sua característica anti-inflamatória. A redução da inflamação e número de granulomas é consoante aos resultados encontrados por nosso grupo de pesquisa, nos quais camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e tratados com lipossomas encapsulando SbV (antimoniato de meglumina) não apresentaram lesões hepáticas após o tratamento (MARCON, 2011).

Os granulomas são formados por células inflamatórias e desta forma facilitam a eliminação do parasito do parênquima hepático após o tratamento (GIUNCHETTI *et al*, 2007). A coadministração dos lipossomas de SbIII junto ao AA permitiu um ganho significativo na preservação da arquitetura hepática, somando os bons resultados apresentados pelos grupos tratados tanto com lipossoma de SbIII quanto com o AA. O sucesso de tratamento para este órgão, apesar da baixa dose utilizada, pode ser notada pela redução significativa da carga parasitária 47% e pela redução de toxicidade decorrente do tratamento.

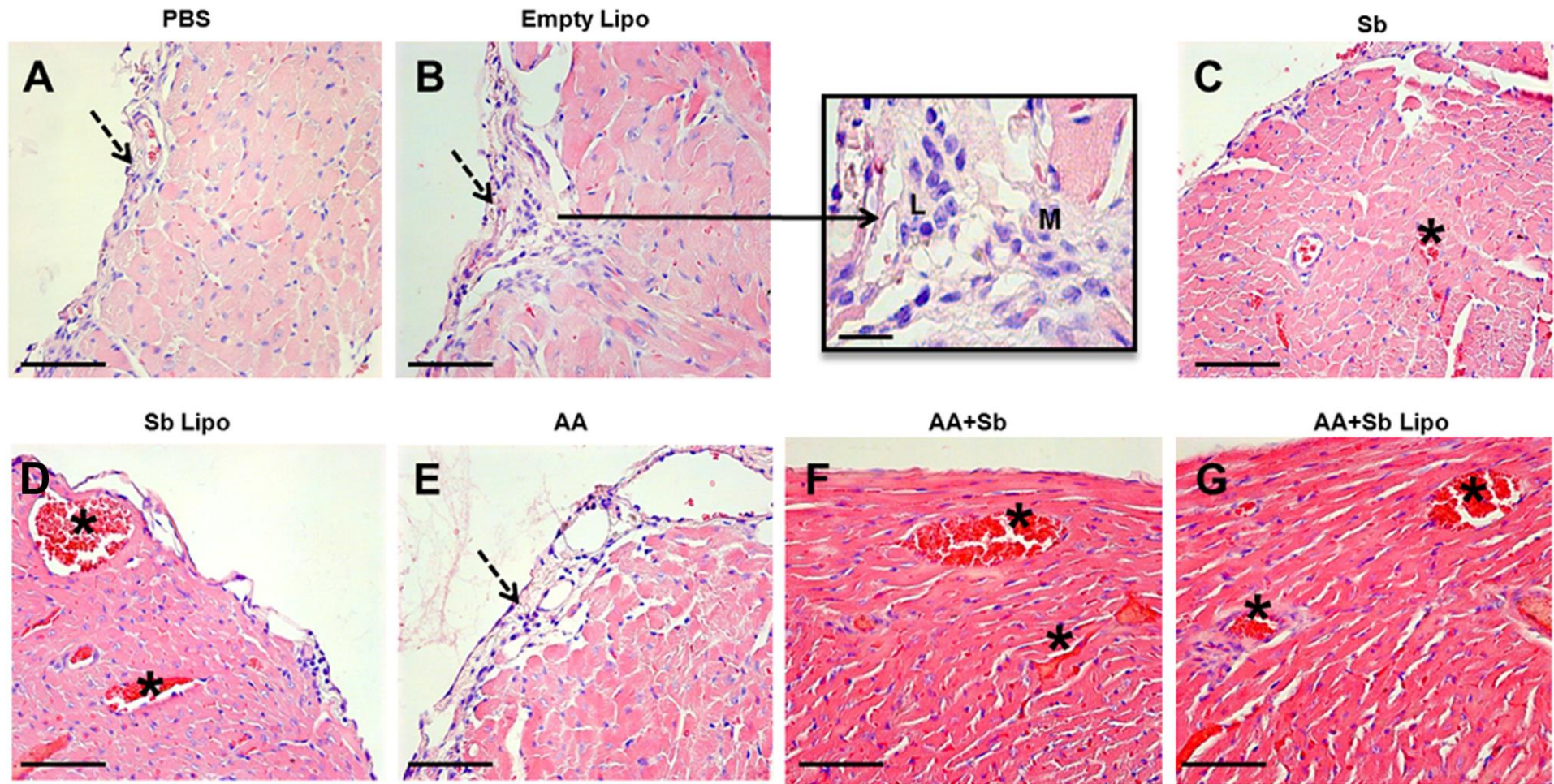
6.10.1 – Análises histopatológicas do tecido cardíaco

Não foram observadas, degeneração celular e/ou arquitetural em nenhum dos grupos avaliados (FIGURA 24). Nos grupos tratados com PBS, AA e lipossomas vazios foi observado infiltrado inflamatório subendocárdico difuso e discreto composto por células mononucleares (FIGURA 24). Estas alterações não foram observadas nos animais dos grupos tratados com SbIII Livre, SbIII Lipossomal ou sua associação ao AA. Entretanto, os animais que receberam SbIII em todas as suas variações evidenciaram uma hiperemia ativa em todo o miocárdio.

Estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa compararam as alterações cardíacas decorrentes da administração de SbIII, AA ou a associação destes dois compostos. Este estudo mostrou que ratos Wistar tratados com 17 mg de SbIII apresentaram degeneração hialina, infiltrado de células inflamatórias e pequenas áreas de necrose, observaram-se ainda alterações no ECG destes animais. No entanto, estas alterações não foram observadas nos animais tratados com AA associado ao SbIII e o tecido cardíaco apresentou aspecto semelhante aos animais dos grupos PBS e AA (REIS, 2010).

Nossos dados sugerem que o tratamento constituído por AA coadministrado aos lipossomas convencionais de SbIII podem permitir a utilização de doses maiores, ou ainda, um esquema terapêutico em várias doses. Estes novos esquemas terapêuticos poderiam reduzir a toxicidade cardíaca e aumentar o efeito leishmanicida em camundongos BALB/c infectados por *L.infantum*. Os nanocarreadores são capazes de encapsular substâncias ativas sem, contudo, alterar sua estrutura química ou seu mecanismo de ação. Além disso, a capacidade destes carreadores serem rapidamente fagocitadas por células do SFM permite que o contato direto fármaco-tecido cardíaco seja reduzido. Assim, a redução dos efeitos cardíacos pode ser atribuída à baixa dose do fármaco livre disponível na corrente sanguínea. As propriedades farmacodinâmicas dos nanocarreadores proporcionam estabilidade às substâncias ativas e proteção aos organismos nos quais as mesmas são administradas. Assim, Leite e colaboradores (2007) obtiveram resultados positivos através do encapsulamento da halofantrina, um fármaco capaz de provocar alterações cardíacas apresentando potencial efeito arritmogênico. As nanocápsulas de halofantrina foram capazes de aumentar a concentração de dose letal, cessar a interferência no intervalo QT corrigido (QTc), diminuir a pressão arterial sistólica, diastólica e batimentos cardíacos com consequente redução da toxicidade *in vivo*.

Figura 24: Foto micrografias dos cortes histológicos (5µm, HE) representativos das alterações histopatológicas no coração de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Tampão fosfato (PBS). (B) Lipossomas convencionais vazios (L vazio). (C) Antimônio trivalente (Sb). (D) Lipossomas convencionais de antimônio trivalente (Lipo Sb). (E) Ácido ascórbico (AA). (F) Associação de ácido ascórbico ao antimônio trivalente (AA+Sb). (G) associação de ácido ascórbico a lipossomas convencionais de antimônio trivalente (AA+Lipo Sb). Barra = 50µm. Inserto = 25 µm, representando infiltrado inflamatório com linfócitos (L) e macrófagos (M). Seta pontilhada = infiltrado inflamatório subendocárdico mononuclear; * = Hiperemia ativa.



A administração de fármacos capazes de provocar alterações histopatológicas cardíacas pode ser minimizada com a administração dos mesmos em veículos carreadores como os lipossomas. Enquanto a pararrubicina provoca severas alterações no arranjo longitudinal das células do miocárdio, apenas alterações leves nesse arranjo e poucas células inflamatórias podem ser observadas com a administração do mesmo fármaco em formulações lipossomais (CONG *et al*, 2012).

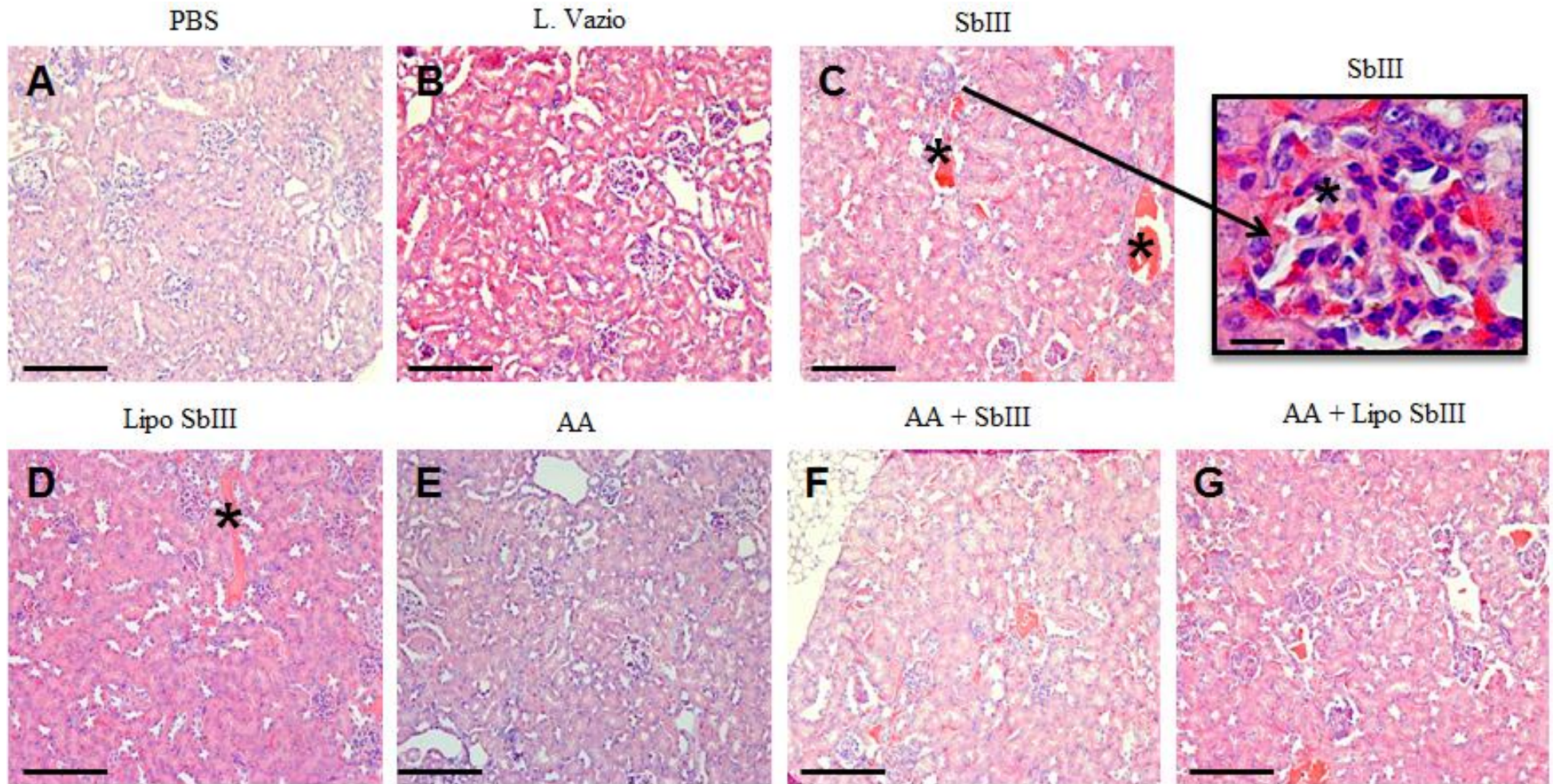
6.10.1 – Análises histopatológicas do tecido renal

Neste trabalho, não foram observadas alterações na morfologia glomerular das células mesangiais ou glomerulonefrite evidente, bem como presença de degeneração e/ou cilindros hialinos intratubulares em nenhum dos grupos avaliados (FIGURA 25). Entretanto, os animais tratados com SbIII livre, lipossomas de SbIII, AA associado ao SbIII e AA associado à lipossoma de SbIII apresentaram hiperemia ativa que variou de moderada a leve, e sugerem alterações no sistema endotelial e/ou produção de óxido nítrico (FIGURA 25). Observando-se o padrão da hiperemia ativa, nota-se que o encapsulamento do SbIII nos lipossomas provoca a redução desta congestão e esta é ainda menor quando há a associação destes lipossomas com o AA. Os resultados encontrados pelas análises histopatológicas do tecido renal dos grupos tratados com SbIII, lipossoma de SbIII, AA associado ao SbIII e AA associado aos lipossomas de SbIII são observados pela ação deste composto diretamente no tecido renal durante a excreção.

Sabe-se que os rins de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* apresentam-se normais, sem sinais de patologia, independente da concentração do inóculo (CARRIÓN *et al*, 2006). Apesar de ser relatado que a presença de anticorpos parasito-específicos formem imunocomplexos nos rins e subsequente desenvolvimento de glomerulonefrite (NIETO *et al*, 2011).

Segundo Hantson e colaboradores (2000) o monitoramento da excreção urinária de Sb indica que os rins são a rota quase exclusiva de eliminação deste semimetal. Assim, esse dado serve como um alerta de que apesar de não existirem orientações específicas para o ajuste da dose de antimoniais na insuficiência renal, esta prática clínica deveria ser rotineiramente adotada.

Figura 25: Fotomicrografias dos cortes histológicos (5µm, HE) representativas das alterações histopatológicas nos rins de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Tampão fosfato (PBS). (B) Lipossomas convencionais vazios (L vazio). (C) Antimônio trivalente (Sb). (D) Lipossomas convencionais de antimônio trivalente (Lipo Sb). (E) Ácido ascórbico (AA). (F) Associação de ácido ascórbico ao antimônio trivalente (AA+Sb). (G) associação de ácido ascórbico a lipossomas convencionais de antimônio trivalente (AA+Lipo Sb). Barra = 50 µm. Inserto = 25 µm. A, B e E parênquima renal de aspecto normal. Figuras C, D, F e G apresentando hiperemia ativa. * = vasos hiperêmicos.



7 - SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Os experimentos iniciais permitiram o conhecimento do tropismo tecidual da cepa C43 de *L. infantum* para os órgãos fígado, baço e medula óssea e possibilitaram o delineamento experimental do trabalho proposto;
- A formulação lipossomal de SbIII proposta apresenta um bom perfil de liberação *in vitro*, sendo compatível para o tratamento da leishmaniose. No entanto, apresenta baixa estabilidade e pode ser aprimorada com ajustes na composição ou proporção dos lipídios. A caracterização sugere que a preparação lipossomal convencional de SbIII apresentou-se com tamanho e índice de polidispersão adequados para a vetorização do fármaco tanto para fígado e baço quanto para a medula óssea;
- O SbIII lipossomal na dose 9 mg Sb/Kg foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço, fígado e medula óssea dos animais em experimentação. O tratamento com SbIII livre na mesma dose (9 mg Sb/Kg) não foi capaz de reduzir a carga parasitária em nenhum dos órgãos avaliados. A coadministração de AA ao SbIII na sua forma livre ou veiculado em lipossomas convencionais não provoca redução na atividade leishmanicida do SbIII.
- As análises dos parâmetros bioquímicos mostraram ausência de toxicidade pelos diferentes tratamentos após duas semanas de sua administração. Os dados histopatológicos mostraram que a administração de SbIII encapsulado em lipossomas convencionais associado ou não ao AA, não induziu toxicidade nos tecidos hepático, cardíaco e renal.

8 - CONCLUSÃO

- Dentre os protocolos de tratamentos avaliados neste trabalho, a coadministração de lipossomas convencionais de SbIII e AA apresentou-se como a melhor alternativa de tratamento aos camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*, apresentando alta atividade leishmanicida sem efeitos tóxicos.

9 - REFERÊNCIAS

AFRIN, F., DEY, T., ANAM, K., ALI, N. Leishmanicidal activity of stearylamine-bearing liposomes in vitro. **J Parasitol**, v.87(1), p.188-93, 2001

AHMED, S., COLMENARES, M., SOONG, L., GOLDSMITH-PESTANA, K., MUNSTERMANN, L., MOLINA, R., MCMAHON-PRATT, D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infect Immun.**, v. 71(1), p. 401-10, 2003

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

ALVING, C. R., STECK, E. A., CHAPMAN, W. L. JR., WAITS, V. B., HENDRICKS, L. D., SWARTZ, G. M. JR., HANSON, W. L. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75(6), p.2959-63, 1978

ALVING, C. R., SWARTZ, G. M. JR., HENDRICKS, L. D., CHAPMAN, W. L. JR., WAITS, V. B., HANSON, W. L. Liposomes in leishmaniasis: effects of parasite virulence on treatment of experimental leishmaniasis in hamsters. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 78(3), p.279-86, 1984a ??

ANDERSEN, E. M., CRUZ-SALDARRIAGA, M., LANOS-CUENTAS, A., LUZ-CJUNO, M., ECHEVARRIA, J., MIRANDA-VERASTEGUI, C., COLINA, O., BERMAN, J. D. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 72(2), p. 133-7, 2005

ANTEZANA, G., ZEBALLOS, R., MENDOZA, C., LYEVRE, P., VALDA, L., CARDENAS, F., NORIEGA, I., UGARTE, H., DEDET, J. P. Electrocardiographic alterations during treatment of mucocutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate and allopurinol. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 86(1), p. 31-3, 1992

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

AZEVEDO, E. G., RIBEIRO, R. R., FERREIRA, C. S., SILVA, S. M., SCHETTINI, D. A, MICHALICK, M. S. M., DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Prolonged blood circulation time of antimony in dogs with visceral leishmaniasis from liposomes with 175-nm diameter. **J Nanomedic Biotherapeu Discover**, 1:2. 2011

BACHLEITNER-HOFMANN, T., GISSLINGER, B., GRUMBECK, E., GISSLINGER, H. Arsenic trioxide and ascorbic acid: synergy with potential implications for the treatment of acute myeloid leukaemia?. **Br J Haematol**, v. 112(3), p.783-6, 2001

BAHLIS, N. J., MCCAFFERTY-GRAD, J., JORDAN-MCMURRY, I., NEIL, J., REIS, I., KHARFAN-DABAJA, M., ECKMAN, J., GOODMAN, M., FERNANDEZ, H. F., BOISE, L. H., LEE, K. P. Feasibility and correlates of arsenic trioxide combined with ascorbic acid-mediated depletion of intracellular glutathione for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. **Clin Cancer Res.**, v. 8(12), p.3658-68, 2002

- BAJAJ, G., YEO, Y. Drug delivery systems for intraperitoneal therapy. **Pharm Res.**, v. 27(5), p.735-8, 2010
- BALANÑA-FOUCE, R., REGUERA, R. M., CUBRÍA, J. C., ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen Pharmacol**, v.30(4), p.435-43, 1998
- BANERJEE, A., DE, M., ALI, N. Combination therapy with paromomycin-associated stearylamine-bearing liposomes cures experimental visceral leishmaniasis through Th1-biased immunomodulation. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55(4), p.1661-70, 2011
- BATISTA, C. M, CARVALHO, C. M. B., MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Braz Jour of Pharm Scies**, v. 43, n. 2, 2007.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis**, v. 24, p. 684, 1997
- BOUDOURIS, G., VERGINADIS, I. I., SIMOS, Y. V., ZOURIDAKIS, A., RAGOS, V., KARKABOUNAS, S. C., EVANGELOU, A. M. Oxidative stress in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and the significant role of vitamin C and E supplementation. **Int Urol Nephrol**, 2012
- CARRIÓN, J., NIETO, A., IBORRA, S., INIESTA, V., SOTO, M., FOLGUEIRA, C., ABANADES, D. R., REQUENA, J. M., ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Paras. Immunol.**, v. 28, p. 173-183, 2006
- CARTER, K. C., HUTCHISON, S., BOITELLE, A., MURRAY, H. W., SUNDAR, S., MULLEN, A. B. Sodium stibogluconate resistance in *Leishmania donovani* correlates with greater tolerance to macrophage antileishmanial responses and trivalent antimony therapy. **Parasitol.** v. 131(Pt 6), p. 747-57, 2005
- CESTA, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicol Pathol**, v. 34(5), p. 455-65, 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 Microbiol**, v. 5(11), p. 873-82, 2007
- CHISTOPHERSON, J. B. *Lancet*. v. 2, p. 325, 1918
- CHULAY, J. D., SPENCER, H. C., MUGAMBI, M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). **Am J Trop Med Hyg**, v. 34 (4), p. 702-9, 1985
- CONG, W., LIANG, Q., LI, L., SHI, J., LIU, Q., FENG, Y., WANG, Y., LUO, G. Metabonomic study on the cumulative cardiotoxicity of a pirarubicin liposome powder. **Talanta**, v. 89, p. 91-8, 2012
- CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Trop Med Int Health**, v. 6 (11), p. 899-905, 2001

CRUZ, A., RAINEY, P. M., HERWALDT, B. L., STAGNI, G., PALACIOS, R., TRUJILLO, R., SARAVIA, N. G. Pharmacokinetics of antimony in children treated for leishmaniasis with meglumine antimoniate. **J Infect Dis.** v. 195(4), p. 602-8, 2007

CUNNINGHAM, M. L., FAIRLAMB, A. H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterization and inhibition by trivalent antimonials. **Eur J Biochem**, v. 230 (2), p. 460-8, 1995

DE MELO, A. L., SILVA-BARCELLOS, N. M., DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **Int J Pharm**, v. 255 (1-2), p. 227-30, 2003

DEMICHELI, C., FRÉZARD, F., LECOUCVEY, M., GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony (V) complex formation with adenine nucleoside in aqueous solution. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1570, p. 192, 2002

DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Novas embalagens para medicamentos à base de Antimônio usados no tratamento da Leishmaniose e esquistossomose. **Cadernos temáticos de química nova na escola**, v. 6, p. 24-30, 2005

DENTON, H., MCGREGOR, J. C., COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochem J**, v. 381 (Pt 2), p. 405-12, 2004

DEY, T., ANAM, K., AFRIN, F., ALI, N. Antileishmanial activities of stearylamine-bearing liposomes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44 (6), p. 1739-42, 2000

DUCONGE, J., MIRANDA-MASSARI, J. R., GONZALEZ, M. J., JACKSON, J. A., WARNOCK, W., RIORDAN, N. H. Pharmacokinetics of vitamin C: insights into the oral and intravenous administration of ascorbate. **P R Health Sci J**, v. 27 (1), p. 7-19, 2008

EBUEHI, O. A., OGEDEGBE, R. A., EBUEHI, O. M. Oral administration of vitamin C and vitamin E ameliorates lead-induced hepatotoxicity and oxidative stress in the rat brain. **Nig Q J Hosp Med**, v. 22 (2), p. 85-90, 2012

ELMORE, S. A. Enhanced histopathology of the spleen. **Toxicol Pathol**, v. 34(5), p. 648-55, 2006

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccine. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 32, p. 181, 1999

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., FERREIRA, C. S., COSTA, M. A. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45 (3), p. 913-6, 2001a

FRÉZARD, F., SCHETTINI, D. A., ROCHA, O. G. F., DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, No. 3, p. 511-518, 2005b

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14 (7), p. 2317-36, 2009c

- FRÉZARD, F., DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opin. Drug Deliv**, v. 7 (12), p. 1343-58, 2010d
- 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 (2), p. 269-77, 2008
- GOODWIN, L. G., PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem J**, v. 37 (2), p. 198-209, 1943
- GOURBAL, B., SONUC, N., BHATTACHARJEE, H., LEGARE, D., SUNDAR, S., OUELLETTE, M., ROSEN, B. P., MUKHOPADHYAY, R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. **J Biol Chem**, v. 279 (30), p. 31010-7, 2004
- GRADONI, L., GRAMICCIA, M., SCALONE, A. Visceral leishmaniasis treatment, Italy. **Emerg Infect Dis**, v. 9 (12), p. 1617-20, 2003
- 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 (2), p. 222-30, 1984
- HANTSON, P., LUYASU, S., HAUFROID, V., LAMBERT, M. Antimony excretion in a patient with renal impairment during meglumine antimoniate therapy. **Pharmacot**, v. 20 (9), p. 1141-3, 2000
- HARIKRISHNAN, R., ABHILASH, P. A., DAS, S. S., PRATHIBHA, P., REJITHA, S., JOHN, F., KAVITHA, S., INDIRA, M. Protective effect of ascorbic acid against ethanol-induced reproductive toxicity in male guinea pigs. **Br J Nutr**, p. 1-10, 2013
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999
- HIRANO, K., HUNT, C. A. Lymphatic transport of liposome-encapsulated agents: effects of liposome size following intraperitoneal administration. **J. Pharm. Sci.**, v. 74, p. 915-21, 1985
- HUNTER, D. G., FRISKEN, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. **Biophys J**, v. 74 (6), p. 2996-3002, 1998
- IQBAL, K., KHAN, A., KHATTAK, M. A. K. Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health – A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 3, p. 5-13, 2004
- JHA, T. K. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. **Indian J. Med Res**, v. 123, p. 389-398, 2006
- 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. 241 p
- KASHANI, M. N., FIROOZ, A., ESKANDARI, S. E., GHOORCHI, M. H., KHAMESIPOUR, A., KHATAMI, A., JAVADI, A., DOWLATI, Y. Evaluation of meglumine antimoniate effects on liver, kidney and pancreas function tests in patients with cutaneous leishmaniasis. **Eur J Dermatol**, v. 17 (6), p. 513-5, 2007

- LAPCHIK V. B, V., MATTARAIA V. G. M., KO G. M. (Orgs). Cuidados e Manejo de Animais de laboratório. São Paulo: Atheneu, 2009. 730p
- LAWN, S. D., ARMSTRONG, M., CHILTON, D., WHITTY, C. J. Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis among returned travellers. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100(3), p. 264-9, 2006
- LÉGARÉ, D., RICHARD, D., MUKHOPADHYAY, R., STIERHOF, Y. D., ROSEN, B. P., HAIMEUR, A., PAPADOPOULOU, B., OUELLETTE, M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. **J Biol Chem**, v. 276 (28), p. 26301-7, 2001
- LEITE, E. A., GRABE-GUIMARÃES, A., GUIMARÃES, H. N., MACHADO-COELHO, G. L., BARRATT, G., MOSQUEIRA, V. C. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life Sci**, v. 80 (14), p. 1327-34, 2007
- LEVINE, M., CONRY-CANTILENA, C., WANG, Y., WELCH, R. W., WASHKO, P. W., DHARIWAL, K. R., PARK, J. B., LAZAREV, A., GRAUMLICH, J. F., KING, J., CANTILENA, L. R. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93 (8), p. 3704-9, 1996
- LICIO, Carolina Souza Andrade Licio. Avaliação da Toxicidade Aguda do Antimônio Trivalente: formas livre ou lipossomal associada ou não à administração de ácido ascórbico. Dissertação (Mestrado). Escola de Farmácia, Cipharma. Universidade Federal de Ouro Preto, 2012 - em andamento.
- MACHADO, L. C., GNOATTO, S. A., KLÜPPEL, M. L. W. Liposomes applied in pharmacology: a review. **Estud. Biol**, v. 29, n. 67, 2007
- MACIEL, N. R., REIS, P. G., KATO, K. C., VIDA, L. A. T., GUIMARÃES, H. N., FRÉZARD, F., SILVA-BARCELLOS, N. M., GRABE-GUIMARÃES, A. Reduced cardiovascular alterations of tartar emetic administered in long-circulating liposomes in rats. **Toxicol Lett**, v. 199 (3), p. 234-8, 2010
- MALHOTRA, D., FLETCHER, A. L., TURLEY, S. J. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. **Immunol Rev**, v. 251 (1), p. 160-76, 2013
- MARCON, L. D., Efeito do tratamento lipossomal com antimoniato de meglumina em camundongos infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Análise das vias de administração e da resposta ao fármaco em modelo de desnutrição. 2011. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG
- MARQUES-DA-SILVA, E. A., COELHO, E. A., GOMES, D. C., VILELA, M. C., MASIOLI, C. Z., TAVARES, C. A., FERNANDES, A. P., AFONSO, 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. **Parasitol Res**, v. 98, p. 67-74, 2005
- MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 18, p. 87, 1985

- MAYER, L. D.; HOPE, M. J. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, p. 193-197, 1985.
- 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 (5), p. 538-48, 2009
- MONNARD, P. A., OBERHOLZER, T., LUISI, P. L. Entrapment of nucleic acids in liposomes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1329, n. 1, p. 39-50, 1997.
- MOTTA, V. T. *Bioquímica clínica para laboratórios – princípios e interpretações*. Rio de Janeiro: Medbook – Editora Científica Ltda, 2009. 400 p
- MOUGNEAU, E., BIHL, F., GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol Rev**, v. 240 (1), p.286-96, 2011
- MUKHOPADHYAY, R., DEY, S., XU, N., GAGE, D., LIGHTBODY, J., OUELLETTE, M., ROSEN, B. P. Trypanothione over production and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93 (19), p.10383-7, 1996
- MURRAY, H. W., DELPH-ETIENNE, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 68 (1), p. 288-93, 2000
- NAYAR, R., HOPE, M. J., CULLIS, P. R. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 986 , p. 200-206, 1989.
- NEW, R. R., CHANCE, M. L., THOMAS, S. C., PETERS, W. Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. **Nature**, v. 272 (5648), p. 55-6, 1978
- 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. **Veterinary Research**, v. 42:39, 2011
- RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESÚS, M. N., MARZAL, P. C., JUNIOR, H. F. A., TEMPONE, A. G. Antimonials empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003
- REIS, G. R. Toxicidade do arsênio e do antimônio trivalentes: influência da encapsulação em lipossomas e da associação ao ácido ascórbico. 2010. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG. 122 f.
- RIBEIRO, R. R., MOURA, E. P., PIMENTEL, V. M., SAMPAIO, W. M., SILVA, S. M., SCHETTINI, D. A., ALVES, C. F., MELO, F. A., TAFURI, W. L., DEMICHELI, C., MELO, M. N., FRÉZARD, F., MICHALICK, M. S. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52 (7), p. 2564-72, 2008
- ROBERTS, W. L., BERMAN, J. D., RAINEY, P. M. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39 (6), p. 1234-9, 1995

- SADEGHIAN, G., ZIAEI, H., SADEGHI, M. Electrocardiographic changes in patients with cutaneous leishmaniasis treated with systemic glucantime. **Ann Acad Med Singapore**, v. 37 (11), p. 916-8, 2008
- SCHETTINI, D. A., COSTA VAL, A. P., SOUZA, L. F., DEMICHELI, C., ROCHA, O. G., MELO, M. N., MICHALICK, M. S., FRÉZARD, F. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. **Braz J Med Biol Res**, v. 36 (2), p. 269-72, 2003
- SCHETTINI, D. A., RIBEIRO, R. R., DEMICHELI, C., ROCHA, O. G., MELO, M. N., MICHALICK, M. S., FRÉZARD, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **Int J Pharm**, v. 315 (1-2), p. 140-7, 2006a
- SERAFIM, T. D., MALAFAIA, G., SILVA, M. E., PEDROSA, M. L., REZENDE, S. A. Immune response to *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection is reduced in malnourished BALB/c mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105 (6), p. 811-7, 2010
- SERENO, D., HOLZMULLER, P., MANGOT, I., CUNY, G., OUAISSI, A., LEMESRE, J. L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45 (7), p. 2064-9, 2001
- SHAKED-MISHAN, P., ULRICH, N., EPHROS, M., ZILBERSTEIN, D. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 276 (6), p. 3971-6, 2001
- SOTO, J., VALDA-RODRIGUEZ, L., TOLEDO, J., VERA-NAVARRO, L., LUZ, M., MONASTERIOS-TORRICO, H., VEGA, J., BERMAN, J. Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71 (5), p. 577-81, 2004
- STANLEY, A. C., ENGWERDA, C. R., Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 138-147, 2007
- SUN, H., YAN, S. C., CHENG, W. S. Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione implication for its mode of action. **Eur J Biochem**, v. 267 (17), p. 5450-7, 2000
- SUNDAR, S., MONDAL, D., RIJAL, S., BHATTACHARYA, S., GHALIB, H., KROEGER, A., BOELAERT, M., DESJEUX, P., RICHTER-AIRIJOKI, H., HARMS, G. Implementation research to support the initiative on the elimination of kala-azar from Bangladesh, India and Nepal--the challenges for diagnosis and treatment. **Trop Med Int Health**, v. 13 (1), p. 2-5, 2008
- SUNDAR, S., CHAKRAVARTY, J., AGARWAL, D., RAI, M., MURRAY, H. W. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med**, v. 362 (6), p. 504-12, 2010a
- TEMPONE, A. G.; ANDRADE, J. R., HEITOR, F. Nanoformulations of pentavalent antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes demonstrate highest efficacy against experimental visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, v. 67, n. 2, 2008
- TITUS, R. G., MARCHAND, M., BOON, T., LOUIS, J. A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol**, v. 7, p. 545-555, 1985

VIANNA, G. Comunicação à Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Arq. Bras. Med.**, v. 2, p. 426. 1912

VIDAL, A. T., GUIMARÃES, H. N., DE PAULA, D. C., FRÉZARD, F., SILVA-BARCELLOS, N. M., GRABE-GUIMARÃES, A. Prolonged cardioprotective effect of pyridostigmine encapsulated in liposomes. **Life Sci**, v. 86 (1-2), p. 17-23, 2010

WYLLIE, S., CUNNINGHAM, M. L., FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 279 (38), p. 39925-32, 2004

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em:<http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf>

WORTMANN, G., MILLER, R. S., OSTER, C., JACKSON, J., ARONSON, N. A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10- or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. **Clin Infect Dis**, v. 35(3), p. 261-7, 2002

ZAGHLOUL, I. Y., AL-JASSER, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 98 (8), p. 793-800, 2004

ZANONI, L. Z., BRUSTOLONI, Y. M., MELNIKOV, P., CÔNSOLO, C. E. Antimony containing drug and ECG abnormalities in children with visceral leishmaniasis. **Biol Trace Elem Res**, v. 132 (1-3), p. 35-40, 2009

ZHOU, Y., MESSIER, N., OUELLETTE, M., ROSEN, B. P., MUKHOPADHYAY, R.. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. **J Biol Chem**, v. 279 (36), p.37445-51, 2004