

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

TAMARA CRISTINA MOREIRA LOPES

**Avaliação do efeito do fenômeno de depuração
sanguínea acelerada de formulação lipossomal
peguilada contendo tártaro emético em camundongos
BALB/c infectados com *Leishmania infantum***

OURO PRETO

2016

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

**Avaliação do efeito do fenômeno de depuração
sanguínea acelerada de formulação lipossomal
peguilada contendo tártaro emético 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: Profa. Dra. Simone Aparecida Rezende

Co-orientador: Prof. Dr. José Mário Barichello

Ouro Preto – Minas Gerais - Brasil

Março – 2016

L864a Lopes, Tamara Cristina Moreira.
Avaliação do efeito do fenômeno de depuração sanguínea acelerada de
formulação lipossomal peguilada contendo tártaro emético em camundongos
BALB/c
infectados com Leishmania infantum [manuscrito] / Tamara Cristina
Moreira Lopes. - 2016.
88f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Aparecida
Rezende. Coorientador: Prof. Dr. José Mário
Barichello.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola
de Farmácia. Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Vacinas.

1. Leishmaniose. 2. Tartaro emetico. 3. Sangue. I. Rezende, Simone
Aparecida. II. Barichello, José Mário. III. Universidade Federal de
Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161

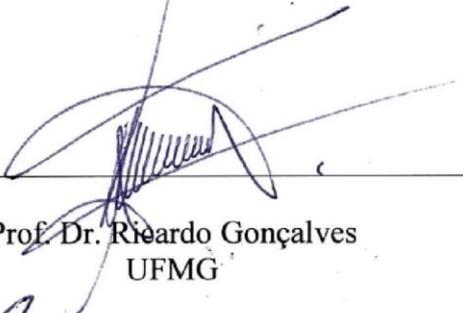
Catálogo: www.sisbin.ufop.br



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 114ª 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 **Tamara Cristina Moreira Lopes**, com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação do efeito do fenômeno de depuração sanguínea acelerada de formulação lipossomal peguilada contendo tártaro emético em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 20 de abril de 2016.



Prof. Dr. Ricardo Gonçalves
UFMG



Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos
UFOP

Somente o coração alimentado de amor e o cérebro enriquecido de sabedoria podem refletir-lhe a grandeza.

(Emmanuel)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por prover que todos esses momentos fossem vivenciados. Ao meu anjo da guarda que é a minha companhia diária, que me rege, me governa e me ilumina. Sou grata ao amor e ao incentivo dos meus pais, que sempre batalharam pela educação dos filhos. Ao meu irmão que não esteve presente fisicamente grande parte destes dois anos, mas que com seu carinho e sua amizade preencheu os meus dias de alegria e coragem e se manteve presente de coração nessa caminhada. Agradeço como um todo a minha grande família Moreira Lopes, vocês foram fundamentais por mais esta conquista.

A minha orientadora, Simone, pela oportunidade do trabalho e do aprendizado, que sempre esteve presente e de prontidão a me ajudar. Ao Wanderson, meu querido amigo e mestre, que muito contribuiu para minha formação acadêmica e por sua dedicação ao nosso projeto. Também agradeço ao Barichello pelo apoio. À Débora, amiga e companheira indispensável nessa conquista. Ao Walyson e todos os demais colegas e funcionários do CiPharma. Aos laboratórios de Imunopatologia (NUPEB/UFOP), Morfopatologia (DECBI/UFOP), Laboratório de Farmacologia Experimental (CiPharma/UFOP), Laboratório de Fitotecnologia (CiPharma/UFOP), Laboratório Multiusuário (CiPharma/UFOP), Laboratório Multiusuário (NUPEB/UFOP) e Laboratório de Nanotecnologia e Sistemas Nanoestruturados (UFMG) pela contribuição e pelos ensinamentos. As entidades, CAPES, CnPq e UFOP pelo apoio.

Às minhas queridas amigas, Polyana, Júlia, Sabrine e as demais moradoras que passaram pelo nosso lar, sou grata a vocês pela excelente convivência, companhia e amizade.

À casa espírita “Novo Sol Brilhante” pelo equilíbrio, força e paz constantemente oferecidos nesta árdua jornada.

Ao Paulinho pelo companheirismo, cuidados e alegrias que me proporciona e a todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho, sem o apoio e o amparo de vocês essa conquista jamais seria possível.

RESUMO

Os fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses apresentam diversas limitações, o que faz com que a sua associação a lipossomas apresente-se como uma opção promissora. Estudos avaliaram o efeito do tratamento da leishmaniose murina com lipossomas peguilados (Lpeg), sistema de vetorização usado quando o alvo não é o macrófago, contendo antimonial pentavalente observando uma maior eficácia do tratamento. Por outro lado, a literatura tem mostrado que, ao se administrar uma primeira dose de Lpeg vazios uma semana antes do tratamento com uma dose de Lpeg com um fármaco, ocorrem alterações na farmacocinética e biodistribuição do mesmo, com maior direcionamento para o fígado e para o baço, o que foi denominado de fenômeno de depuração sanguínea acelerada (*ABC*). Esse trabalho visa avaliar a toxicidade das formulações lipossomais e a eficácia destas no tratamento da leishmaniose visceral (LV) murina. Os experimentos *in vivo* foram divididos em duas etapas, em ambas foram usados oito grupos experimentais: grupos sem estimulação do fenômeno *ABC* (1ª dose de tampão fosfato - PBS): controle (PBS), tratado com TE livre, lipossoma convencional (LC) vazio, LC+TE ou Lpeg+TE e grupos com estimulação do fenômeno *ABC* (1ª dose com Lpeg vazio): LC+TE, Lpeg vazio ou Lpeg+TE. Os animais foram pesados e eutanasiados 14 dias após o tratamento. Os resultados desse trabalho mostram que as formulações lipossomais provocaram baixa taxa de hemólise, não promoveram alterações sobre a massa corporal, sobre a série vermelha do sangue e sobre os tecidos hepáticos, esplênicos, renais e cardíacos dos animais. Lpeg+TE foi eficaz em reduzir a carga parasitária no fígado, baço e medula óssea de camundongos infectados, sendo esta formulação de grande importância no tratamento da LV experimental. O fenômeno *ABC* não teve efeito sobre a carga parasitária dos animais tratados com Lpeg apesar de favorecer o direcionamento do TE para o fígado de animais não infectados. A veiculação do TE em lipossomas, com destaque para os lipossomas peguilados, se mostrou uma alternativa eficaz em reduzir a toxicidade deste potente fármaco retirado do mercado, mantendo e aprimorando sua importante característica leishmanicida.

ABSTRACT

The drugs available for the treatment of leishmaniasis have several limitations which makes their association with liposomes a promising option. Studies evaluated the effect of treatment of murine leishmaniasis with pegylated liposomes (Lpeg), vectoring system used when the macrophage is not the target, which contained pentavalent antimony and a greater treatment efficacy was observed. Otherwise, data from literature has shown that the administration of a first dose of empty Lpeg one week before the treatment with one dose of Lpeg with drug, influences the pharmacokinetics and biodistribution of drug and a higher targeting to the liver and spleen was observed which was referred as *Accelerated Blood Clearance* or *ABC* phenomenon. This study aimed to evaluate the toxicity of liposomal formulations and the efficiency of the treatment of murine visceral leishmaniasis (VL). The *in vivo* experiments were divided into two steps and both had eight experimental groups: groups without stimulation of *ABC* phenomenon (First dose of phosphate buffer): Control (PBS), treated with free TE, empty conventional liposome (LC), LC+TE or Lpeg+TE and groups with the *ABC* phenomenon (First dose with empty Lpeg): LC+TE, empty Lpeg or Lpeg+TE. The animals were weighed and euthanized 14 days after the treatment. These results show that liposomal formulations promoted a low rate of hemolysis and had no effect on red blood series, no alteration in body, liver or spleen weight and the hepatic, splenic, renal and cardiac tissues. Lpeg+TE was effective in reducing the parasitic load in the liver, spleen and bone marrow from infected mice, being that formulation of a great importance in the treatment of VL experimental. The *ABC* phenomenon had no effect on the parasite load of the animals treated with Lpeg despite favoring the targeting of TE to the liver of non-infected mice. The encapsulation of TE in liposomes was an effective alternative to reduce the toxicity of this powerful drug withdrawn from the market, maintaining and enhancing its important leishmanicide feature.

Sumário

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1 – INTRODUÇÃO	15
2 – REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 – Leishmanioses e formas clínicas	18
2.2 – Ciclo de vida do parasito	19
2.3 – Modelo murino de leishmaniose visceral	22
2.4 – Diagnóstico	23
2.5 – Alterações histopatológicas na leishmaniose visceral	24
2.6 – Tratamento das leishmanioses	25
2.7 – Lipossomas e leishmanioses	27
2.8 – Lipossomas de circulação prolongada	30
2.9 – Fenômeno de depuração sanguínea acelerada (ABC)	31
3 - OBJETIVO GERAL	32
3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 – MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 – Preparo dos lipossomas	34
4.2 – Caracterização dos lipossomas	35
4.3 – Determinação da taxa de encapsulamento de Sb nos lipossomas	36
4.4 – Ensaio de atividade hemolítica	37
4.5 – Animais	37
4.6 – Cepa de <i>Leishmania infantum</i>	38
4.7 – Manutenção da cepa C46 e curva de crescimento	38

4.8 – Infecção dos camundongos BALB/c com <i>Leishmania infantum</i>	38
4.9 – Coleta de sangue e eritrograma	39
4.10 – Determinação da concentração de antimônio no fígado e no baço	39
4.11 – Análises histológicas	40
4.12 – Determinação da carga parasitária no baço, fígado e medula óssea	40
4.13 – ETAPA 2:	42
4.14 – ETAPA 3:	43
4.15 – Análises Estatísticas	44
5 - RESULTADOS	44
5.1 – Caracterização das formulações lipossomais	45
5.2 – Avaliação da atividade hemolítica das formulações lipossomais vazias e contendo tártaro emético e do fármaco livre	48
5.3 – Avaliação da massa corporal, do fígado e do baço de camundongos não infectados e tratados	50
5.4 – Análises histopatológicas dos tecidos do fígado, baço, coração e rins de animais não infectados e tratados	51
5.5 – Determinação da concentração de antimônio trivalente no fígado e no baço de camundongos não infectados	60
5.6 – Curva de crescimento da cepa C46	60
5.7 – Avaliação da massa do fígado e do baço dos camundongos infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados	61
5.8 – Quantificação de parasitos no fígado, baço e medula óssea	61
5.9 – Análises histopatológicas do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> e submetidos aos diversos tratamentos	66
7 - CONCLUSÃO	70
8 – REFERÊNCIAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo evolutivo da <i>Leishmania sp.</i>	20
Figura 2	Principais agentes leishmanicidas empregados no tratamento das leishmanioses.....	27
Figura 3	Representação de lipossomas convencionais e algumas possibilidades de modificação das vesículas.....	29
Figura 4	Mecanismo proposto para o fenômeno de depuração sanguínea acelerada.....	32
Figura 5	Metodologia de preparo das formulações lipossomais.....	35
Figura 6	Delineamento experimental dos tratamentos e indução do fenômeno ABC.....	42
Figura 7	Delineamento experimental do experimento de indução do fenômeno ABC, e da avaliação da atividade leishmanicida dos tratamentos propostos aos camundongos BALB/c.....	44
Figura 8	Porcentagem de hemólise provocada pelas formulações lipossomais e pelo fármaco em sua forma livre.....	49
Figura 9	Número de hemácias e concentração de hemoglobina de camundongos BALB/c não infectados submetidos aos diferentes tratamentos.....	49
Figura 10	Massa corporal, do fígado e do baço de camundongos BALB/c não infectados e submetidos aos diferentes tratamentos.....	51
Figura 11	Fotomicrografias representativas do padrão histopatológico do coração de animais não infectados e tratados com as diferentes formulações, corados com hematoxilina e eosina.....	54
Figura 12	Fotomicrografias representativas do padrão histopatológico dos rins de animais não infectados e tratados com as diferentes formulações, corados com hematoxilina e	

	eosina.....	56
Figura 13	Concentração de antimônio no fígado e no baço de camundongos BALB/c não infectados após tratamento com tártaro emético livre e em formulações lipossomais.....	59
Figura 14	Curva de crescimento <i>in vitro</i> dos parasitos da cepa C46 de <i>Leishmania infantum</i> em meio Grace 10% de soro fetal bovino.....	61
Figura 15	Massa do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos.....	62
Figura 16	Carga parasitária no fígado, baço e medula óssea de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos.....	64
Figura 17	Fotomicrografias representativas das principais lesões observadas em cortes de fígado de animais não infectados e tratados (a – h) e animais infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (i–p), corados com hematoxilina e eosina.....	68
Figura 18	Fotomicrografias representativas das principais lesões observadas em cortes de baço de animais não infectados e tratados (a – h) e animais infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (i–p), corados com hematoxilina e eosina.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta da população de lipossomas de três preparações independentes analisadas em triplicata.....	47
Tabela 2	Porcentagem de encapsulação da população de lipossomas de três preparações independentes analisadas.....	47
Tabela 3	Avaliações histológicas do fígado de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados.....	67
Tabela 4	Avaliações histológicas do baço de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
ABC	Depuração sanguínea acelerada
AGP	Guanosina trifosfato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CCA	Centro de Ciência Animal
CHOL	Colesterol
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animal
DMEM	Meio essencial mínimo Dulbecco
DSPC	Distearoilfosfatidilcolina
DSPE-PEG	Distearoil-fosfatidiletanolamina acoplado a polímero de polietilenoglicol
EDL	<i>Electrodeless Discharge Lamps</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
H&E	Coloração por hematoxilina e eosina
HNO ₃	Ácido nítrico
IFN- γ	Interferon - gama
Ig	Imunoglobulina
IP	Índice de polidispersão
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>
Rpm	Rotações por minuto
Sb III	Antimônio trivalente
Sb V	Antimônio pentavalente

SFM

Sistema mononuclear fagocitário

1 – INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* transmitidas por espécies de insetos flebotomíneos, sendo a leishmaniose visceral (LV) a forma mais grave da doença, a qual, se não diagnosticada e tratada adequadamente, pode levar o indivíduo ao óbito (ALVAR *et al.*, 2012).

A LV é uma das seis doenças endêmicas mais importantes no mundo devido a sua incidência, alta mortalidade em indivíduos não tratados e crianças desnutridas e aos casos de co-infecção em indivíduos portadores de HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2015), há uma estimativa anual de 310 milhões de pessoas expostas à infecção por *Leishmania sp* e 30.000 mortes.

Historicamente, o tártaro emético (antimonial trivalente – SbIII) foi o primeiro composto utilizado para tratar as leishmanioses (Vianna, 1912), porém os graves efeitos adversos associados a sua utilização resultaram em sua retirada do mercado (CROFT, 2001). Estudos de nosso grupo de pesquisa propuseram a encapsulação do tártaro emético (TE) em lipossomas para reduzir a toxicidade deste, como MACIEL *et al.*, (2010) e REIS (2010) que obtiveram bons resultados ao observarem a redução da cardiotoxicidade do TE quando administrado em formulações lipossomais.

Na LV, Castro *et al.*, (2014) observaram a redução da carga parasitária no fígado, baço e medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* tratados com lipossomas convencionais de TE.

Atualmente, são utilizados na quimioterapia das leishmanioses compostos a base de antimoniais pentavalentes (SbV), anfotericina B, miltefosina e paramomicina que requerem posologias complexas e são frequentemente associados com efeitos colaterais, levando sérias restrições à utilização (RATH *et al.*, 2003). Assim, a alta prevalência das leishmanioses, a inviabilidade econômica da utilização de fármacos alternativos, a elevada toxicidade e a resistência aos fármacos convencionais demonstram a necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos mais eficientes e menos tóxicos (DA SILVA *et al.*, 2012). Conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS), estratégias para o desenvolvimento de novos medicamentos as leishmanioses envolvem o planejamento/síntese de

novas substâncias ativas, modificações químicas de fármacos já conhecidos ou a associação reversível do fármaco já em uso a um sistema transportador, a fim de direcioná-lo ao local alvo, reduzindo sua toxicidade e efeitos colaterais. Entre os sistemas transportadores de fármacos disponíveis, os lipossomas apresentam-se bastante promissores na terapia anti-*Leishmania* (FRÉZARD *et al.*, 2005).

Lipossomas peguilados têm sido amplamente investigados como veículos de fármacos por apresentarem características importantes relacionadas ao aumento do tempo de circulação do fármaco de escolha. Azevedo *et al.*, (2014) demonstraram que lipossomas peguilados contendo antimoniato de meglumina, um antimonial pentavalente (SbV), foram mais efetivos no tratamento da LV em modelo murino que lipossomas convencionais contendo este fármaco, por permanecerem por mais tempo na corrente sanguínea e, conseqüentemente, serem mais direcionados para a medula óssea. Porém, vários trabalhos mostram que administrações repetidas de lipossomas peguilados em certos animais, tais como camundongos, ratos e macacos *Rhesus* resultam em redução do tempo de circulação da segunda dose devido à elevada captura dos lipossomas revestidos com polietilenoglicol (PEG) pelos macrófagos do fígado e do baço, o que foi referido como fenômeno *ABC* (*Accelerated Blood Clearance*) ou depuração sanguínea acelerada (DAMS *et al.*, 2000; ISHIDA *et al.*, 2006).

Considerando a leishmaniose visceral como uma doença altamente prevalente no mundo, com elevada morbidade e mortalidade e devido à escassez de fármacos efetivos para o seu tratamento, a pesquisa de novas alternativas terapêuticas é de suma importância para a saúde humana. Por outro lado, a utilização de nanocarreadores para a administração de fármacos possibilita a diminuição do número de doses, com redução dos efeitos colaterais e o direcionamento do fármaco para o local de ação.

Diante do conhecimento de que o fenômeno *ABC* pode favorecer o direcionamento dos lipossomas para os macrófagos, célula alvo da *Leishmania*, este estudo em questão visou analisar se o fenômeno *ABC* pode direcionar o tártaro emético para os órgãos acometidos pela LV, auxiliando assim na eficácia da redução da carga parasitária e avaliar os efeitos dos

diferentes tratamentos propostos sobre a toxicidade dos tecidos hepáticos, esplênicos, cardíacos e renais.

Assim, nosso trabalho almeja contribuir para o melhoramento do tratamento da LV, tendo por base que resultados obtidos em modelos experimentais utilizando lipossomas são extremamente promissores e nenhuma formulação farmacêutica utilizando lipossomas e antimoniais se encontra disponível no mercado até o presente momento (RIBEIRO *et al.*, 2013).

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Leishmanioses e formas clínicas

As leishmanioses são doenças zoonóticas de transmissão vetorial, consideradas pela OMS um importante problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (ALENCAR; DIETZE, 1991; OMS, 2003). São doenças causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastidae e ao gênero *Leishmania*. É observada a existência de distintas formas clínicas, com diferentes imunopatologias, graus de morbidade e mortalidade. As alterações no organismo, sequenciais à presença do parasito, dependem da infectividade e antigenicidade da *Leishmania* e da resposta imune montada pelo hospedeiro (BORBOREMA, 2010).

As leishmanioses são classificadas na categoria 1 do Programa Especial para Capacitação e Pesquisa em Doenças Tropicais (“*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*” - TDR) como doenças emergentes ou fora do controle, onde o foco deve estar na geração de novos medicamentos e no desenvolvimento de novas intervenções e sistemas (TDR/OMS). Porém, o que se observa é o baixo investimento financeiro direcionado à pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

O espectro clínico das leishmanioses é variável, podendo ser classificadas em quatro diferentes formas clínicas segundo a OMS, 2015:

Leishmaniose cutânea (LC): é a forma mais comum da doença. Causada principalmente por *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis*, no Novo Mundo e por *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica*, no Velho Mundo. As lesões de pele podem caracterizar a forma localizada (única ou múltipla), a forma disseminada (lesões muito numerosas em várias áreas do corpo) e a forma cutânea-difusa. Na maioria das vezes, a doença apresenta-se como uma lesão ulcerada única, que em geral é indolor. As formas localizadas e disseminadas costumam responder bem à terapêutica tradicional. Na forma difusa, rara, as lesões são papulosas ou nodulares, deformantes e graves, distribuídas por toda superfície corporal e, geralmente, o

paciente evolui mal por não responder adequadamente à terapêutica (HELPBURN, 2003).

Leishmaniose mucocutânea (LMC): é caracterizada por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores, causada principalmente pela espécie *L. braziliensis*. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática. Geralmente surge após a cura clínica da LC, com início insidioso e pouca sintomatologia (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998).

Leishmaniose difusa (LD): O principal agente etiológico desta forma clínica é a *L. amazonensis*. 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 deficiente (OMS, 2015; AWASTHI *et al.*, 2004, CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Leishmaniose visceral (LV): é a mais grave de todas as formas sendo frequentemente fatal quando não tratada. A ocorrência da LV é global, e, com exceção da Antártida e da Oceania, há registro de casos nos demais continentes, sendo endêmica em 65 países, dentre eles Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil, onde se concentram cerca de 90% dos casos (OMS 2010). No Brasil, nos últimos 10 anos, a LV foi responsável por mais óbitos que a dengue, sendo que o maior número de casos da doença está no estado de Minas Gerais (SINAN, 2012).

Atualmente, a LV é diretamente associada com doenças imunossupressoras, como a AIDS, aparecendo assim como uma doença oportunista. As manifestações clínicas observadas são hepatoesplenomegalia, febre, comprometimento do estado geral, perda de massa corporal progressiva, anorexia e astenia. As alterações laboratoriais mais frequentes são: anemia, leucopenia e/ou plaquetopenia e hipergamaglobulinemia (BRASIL/MS/SVS, 2006).

2.2– Ciclo de vida do parasito

A descoberta de um dos agentes etiológicos das leishmanioses ocorreu no final do século XIX, quando Cunningham em 1885, na Índia, descreveu formas amastigotas em casos de Calazar. Em 1898, o pesquisador russo

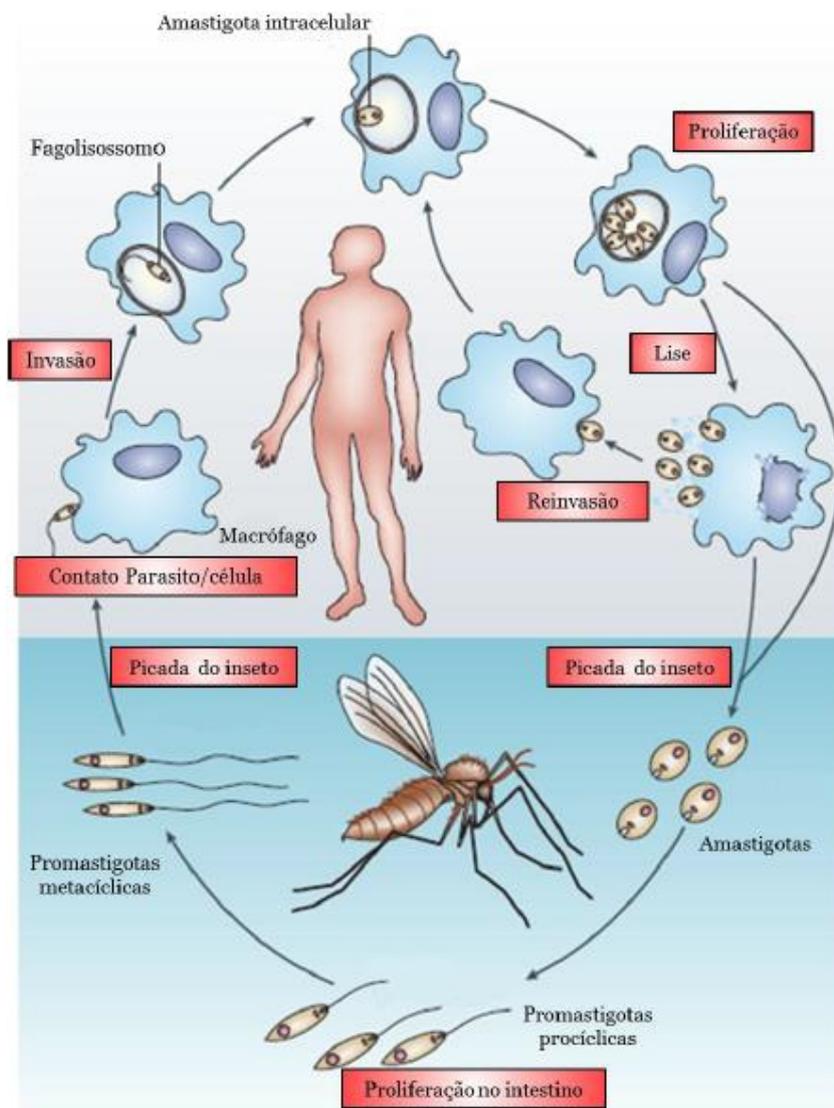
Borovisky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico da doença (HOARE, 1938).

Na LV, os reservatórios do parasito são animais mamíferos, principalmente canídeos, sendo os mais importantes a raposa e o cão, espécies de roedores e marsupiais. No território das Américas, na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção (DEANE; DEANE, 1955).

Os vetores das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. No Brasil, as espécies mais comuns são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo que a *L. longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos (BRASIL/MS/SVS, 2006).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestório anterior, ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas, que reproduzem por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas promastigotas, que também se reproduzem por divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas que se encontram aderidas ao epitélio esofágico e faríngeo do vetor, quando então se diferenciam em formas infectantes – promastigotas metacíclicas. Após este período, as fêmeas infectadas, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas junto à saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema fagocitário mononuclear (SFM). No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente. Na LV, as amastigotas disseminam-se utilizando o sistema vascular e linfático, infiltrando-se nos tecidos ricos em células do SFM, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. Na LC, as amastigotas infectam macrófagos dos tecidos locais (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Figura 1: Ciclo evolutivo da *Leishmania sp.* 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 sistema fagocitário mononuclear 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.



2.3 – Modelo murino de leishmaniose visceral

Vários modelos experimentais de LV foram avaliados, porém, nenhum destes reproduz fielmente a doença manifestada em seres humanos (SUNDAR *et al.*, 2006). No entanto, animais de laboratório apresentam-se como os melhores modelos para a caracterização de doenças e do impacto acarretado ao hospedeiro.

Homens, cães e hamsters com LV apresentam graves sinais e sintomas clínicos, enquanto camundongos apresentam geralmente poucos ou ausência de sinais, em todos os modelos experimentais o tamanho do inóculo do parasito é fator crucial (HOMMEL *et al.*, 1995; REQUENA *et al.*, 2000; CARRIÓN *et al.*, 2006). Estudos experimentais com hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) infectados por *L. infantum* e *L. donovani* apresentaram uma gama de sinais clínicos da LV progressiva como a hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, caquexia e imunossupressão, que mimetizam a infecção ativa no homem e no cão. O modelo hamster apresenta algumas limitações para sua utilização, uma delas é por apresentarem expressão reduzida do gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando a menores concentrações de (NO), o que dificulta o combate ao parasito (MELBY *et al.*, 2001). Além disso, há uma escassez de reagentes para análises imunológicas no modelo hamster de LV (NIETO *et al.*, 2011). O modelo murino apresenta a vantagem de gerar resultados mais rápidos se comparado com estudos em cães, nos quais o desenvolvimento da infecção e doença é significativamente mais lento, além de gerar um menor custo de manutenção dos animais (SANTOS *et al.*, 2003).

O camundongo BALB/c é um modelo murino de infecção subclínica, onde a resposta imune à infecção por *L. infantum* pode variar consideravelmente entre os diferentes órgãos (fígado, baço e medula óssea) em um mesmo animal. No fígado, a infecção é auto limitante, enquanto que o baço e a medula óssea se apresentam como sítios de infecção crônica (NIETO *et al.*, 2011).

Algumas espécies animais expressam o gene *Slc11a1* que codifica uma proteína responsável pelo transporte de íons ferro e manganês para fora do fagolisossoma, o que torna o meio inóspito para o desenvolvimento da forma amastigota, já que estes minerais são essenciais para a replicação e a

sobrevivência do parasito (HUYNH; ANDREWS, 2008). Porém, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 possuem este gene não funcional o que está ligado à susceptibilidade à LV (KAYE *et al.*, 2004).

Além das características genéticas dos camundongos que definem padrões de progressão ou resolução da infecção, existem fatores que podem influenciar nesses padrões, como: o tamanho do inoculo, via de inoculação, a cepa do parasito e a sua procedência e a fonte de isolamento (PEREIRA; ALVES, 2008).

2.4– Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses é baseado no exame clínico e histórico fornecido pelo paciente, pela caracterização da área e pelo diagnóstico laboratorial que pode ser realizado por exame parasitológico, considerado como padrão ouro por apresentar elevada especificidade (HERWALDT, 1999). Esse exame é realizado através do achado de formas amastigotas intracelulares em esfregaços de biópsias de tecidos seccionados da pele, de lesões da mucosa ou tecidos viscerais no caso da LV. As amostras para exame direto são preparadas em lâminas com coloração apropriada (Giemsa ou Leishman) e examinadas à microscopia óptica.

Outra forma de realizar o diagnóstico é através de ensaios sorológicos, baseados na presença de resposta humoral específica (HERWALDT, 1999), dentre eles, os testes de aglutinação direta, imunofluorescência indireta, imunoblotting, imunocromatografia, detecção de antígenos específicos e ensaios imunoenzimáticos como o ELISA (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Por fim, destacam-se os ensaios moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que possui alta especificidade e sensibilidade (GUERIN *et al.*, 2002).

A análise do hemograma e dosagem de proteínas também pode orientar no diagnóstico da doença. Dependendo da forma clínica, pode ocorrer uma diminuição do número total de hemácias, leucopenia e plaquetopenia, além de inversão da relação albumina/globulina (PEARSON; SOUZA, 1996).

Um diagnóstico precoce da doença, seguido de tratamento adequado é crucial para o controle das leishmanioses (DAVIES *et al.*, 2003).

2.5- Alterações histopatológicas na leishmaniose visceral

As alterações histopatológicas apresentadas por portadores da doença são consequência da espécie do parasito e pela resposta montada pelo hospedeiro. Estas alterações estão presentes, em sua grande maioria, nos órgãos naturalmente acometidos pela enfermidade, principalmente aqueles nos quais se concentram as células do SFM, como fígado, baço e medula óssea.

No fígado, as alterações morfológicas podem se manifestar principalmente como: padrão típico, onde a doença é sintomática e a resposta imune do hospedeiro possui um padrão do tipo Th₂, com secreção de citocinas interleucina IL-4, IL-5 e/ou IL-13 ocasionando a progressão da doença; padrão nodular, onde há uma resposta imune com eliminação do parasito e reflete um perfil de resposta do tipo Th₁, secretando IL-2, interferon - gama (IFN- γ), IL-12, IL-16, IL-18, aumentando a resposta inflamatória; ou como manifestações intermediárias, refletindo uma resposta mista (DUARTE, 2011).

Algumas alterações histopatológicas podem ser observadas no fígado de indivíduos com LV, dentre elas a ocorrência de hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer (macrófagos presentes no fígado), granulomas portais e intralobulares, deposição de bilirrubina e fibrose intralobular difusa (ANDRADE; ANDRADE, 1966; SEITZ, 1995).

Camundongos BALB/c são naturalmente susceptíveis à infecção por *Leishmania major*, por apresentarem um padrão inicial de resposta celular Th₂. Porém, a resposta de resistência à LV já é bem caracterizada neste modelo e está associada ao direcionamento da resposta imune para o tipo Th₁, à resposta imune mediada por células envolvendo linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺, à produção de IFN- γ e à formação de granulomas hepáticos (KAYE *et al.*, 2004; MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011).

Na LV murina, os granulomas hepáticos são basicamente constituídos pela fusão das células de Kupffer (macrófagos presentes no fígado) parasitadas, circundadas por células T secretoras de citocinas e por monócitos sanguíneos atraídos pela inflamação (MURRAY, 2001). Entretanto, recentemente observou-se a participação de outros tipos celulares como os linfócitos B e células *natural killer* (NK), (ALBERGANTE *et al.*, 2013). A formação de granulomas é dependente de várias citocinas, sendo a eliminação

do parasito intracelular realizada pelo equilíbrio de citocinas que são capazes de ativar (por exemplo, IFN- γ) ou inibir (por exemplo, IL-10) a atividade leishmanicida dos macrófagos locais (KAYE *et al.*, 2004).

Segundo Gutierrez, Maksem e Reiner (1984), a infecção no baço de camundongos BALB/c inicia-se na primeira semana com a presença de macrófagos parasitados na polpa vermelha. Durante a fase crônica da infecção (>4 semanas) observa-se a incapacidade de resolver a infecção por *L. infantum* havendo alterações da arquitetura esplênica (NIETO *et al.*, 2011). A persistência de parasitos no baço está relacionada à falha de formação de granulomas, esplenomegalia e à ruptura da microarquitetura do tecido linfóide (ENGWERDA *et al.*, 2002).

Smelt *et al.*, (1997) demonstraram a ocorrência de destruição das células dendríticas foliculares e uma perda concomitante do centro germinativo no baço de camundongos BALB/c com LV. A perda das células dendríticas foliculares foi associada à infiltração de macrófagos intensamente parasitados no centro germinativo.

2.6 – Tratamento das leishmanioses

A principal medida de controle de todas as formas de leishmanioses no homem é a quimioterapia (OMS, 2010). No início do século XX, Gaspar Vianna relatou a eficácia de um antimonial trivalente, o tártaro emético, no tratamento da leishmaniose mucocutânea (VIANNA, 1912), e poucos anos após, Di Cristina e Caronia (1915) comprovaram a eficácia do TE no tratamento da LV. Porém, devido aos efeitos tóxicos e graves efeitos adversos associados ao seu uso, como intolerância gastrointestinal e efeitos cardiotoxicos, o TE foi substituído por compostos antimoniais pentavalentes (RATH *et al.*, 2003). Porém, sabe-se que o SbIII é substancialmente mais potente do que o SbV, o que reforça a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do SbV em SbIII sendo, o SbIII o elemento tóxico à *Leishmania* no estado intracelular (SERENO; LEMESRE, 1997), o que reforça a retomada da utilização do TE.

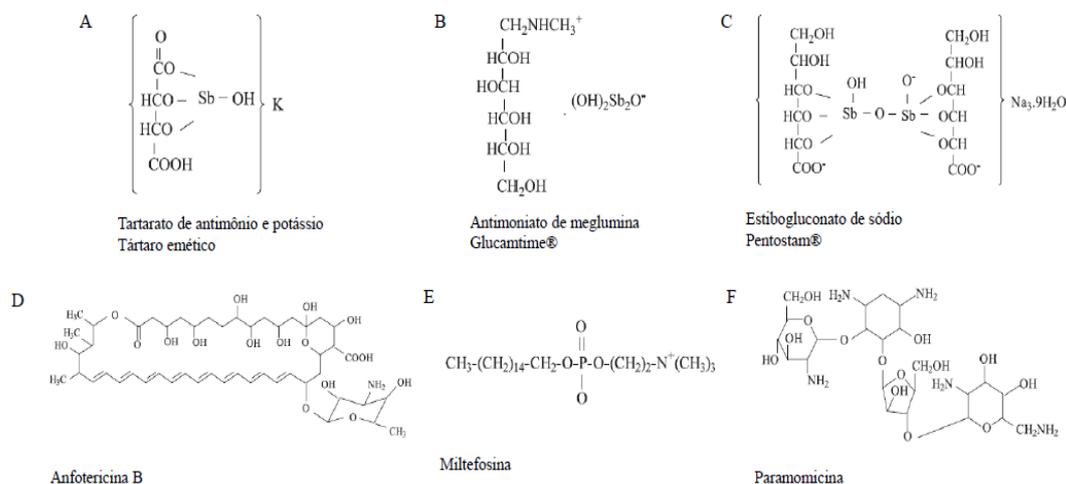
Atualmente, na maioria dos países, o regime terapêutico de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses é baseado na utilização dos antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]). A necessidade de 28 dias de administração parenteral, a presença de efeitos colaterais como cardiotoxicidade, pancreatite, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, a eficácia variável contra as diversas manifestações das leishmanioses e o aparecimento de resistência são fatores que limitam o uso destes medicamentos (HEPBURN *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2009; WISE *et al.*, 2012). Além destes citados, os demais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses apresentam limitações em termos de toxicidade, eficácia variável, preços e esquemas de tratamentos inconvenientes (SANTOS *et al.*, 2008; KATO *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está bem elucidado, uma das hipóteses propostas é que a atividade leishmanicida do Sb pode ser devido ao estímulo de macrófagos do hospedeiro e que estes compostos agem inibindo a produção de adenosina (ATP) e guanosina trifosfato (AGP) através do bloqueio do ciclo do ácido cítrico (FRÉZARD, DEMICHELI, 2010).

Além dos antimoniais, outros fármacos têm sido empregados no tratamento desta doença, entre os quais se destacam a pentamidina, a anfotericina B e a miltefosina (FRÉZARD; DEMICHELI, 2010). No Brasil, a anfotericina B é o fármaco de segunda escolha em casos de toxicidade e refratariedade relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes, além de ser a única opção no tratamento de gestantes (BRASIL, 2003). Recentemente o Ministério da Saúde ampliou a indicação de uso da anfotericina B lipossomal. A medida adotada pelo Ministério, além de diminuir os efeitos adversos causados por outras drogas, garante o acesso a um maior número de pessoas ao medicamento, que é ofertado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

A alta prevalência das leishmanioses, a inviabilidade econômica da utilização de fármacos alternativos, a elevada toxicidade e a resistência aos fármacos convencionais demonstram a necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos mais eficientes e menos tóxicos.

Figura 2: 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.



2.7– Lipossomas e leishmanioses

Alec Bangham e colaboradores, em meados dos anos 60, demonstraram a capacidade de fosfolipídios em soluções aquosas de formar estruturas fechadas em bicamadas, hoje em dia denominado lipossoma (Santos; Castanho, 2002). Já na década seguinte, Gregory Gregoriadis propôs a utilização de lipossomas como sistema transportador de fármacos e sugeriu que a liberação dos mesmos resultava da difusão acelerada através da membrana lipossomal. A liberação do conteúdo lipossomal deve-se ao fato de que o lipossoma perde toda ou parte de sua estabilidade em diferentes meios, expondo seu conteúdo para o meio externo, portanto, a cinética de liberação do lipossoma pode ser controlada pela alteração de sua estabilidade (ANDERSON; OMRI, 2004).

Lipossomas são vesículas esféricas, constituídas por uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (FRÉZARD, 1999), permitindo o encapsulamento de substâncias farmacologicamente ativas tanto em seu compartimento aquoso interno (substâncias hidrossolúveis), quanto em sua membrana (substâncias lipofílicas ou anfifílicas). Além disso, a encapsulação

do fármaco protege o princípio ativo de uma degradação rápida *in vivo* ou mesmo de uma rápida eliminação pelo organismo (FRÉZARD *et al.*, 2005).

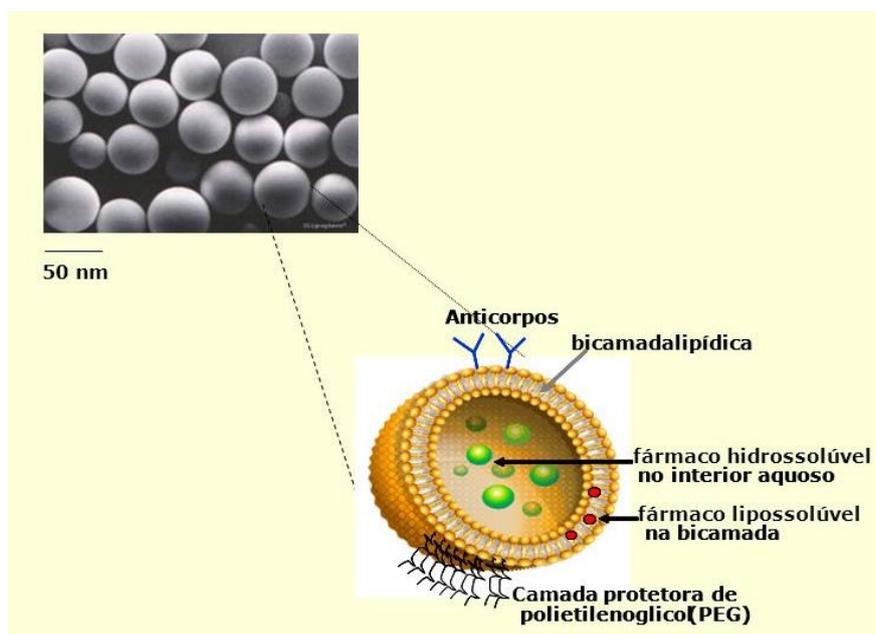
As vesículas lipossomais são basicamente constituídas de lipídios naturais, como a fosfatidilcolina, que apresentam elevada biocompatibilidade com o organismo, e de colesterol. Os fosfolipídios podem se organizar em vesículas de diferentes maneiras, o que é determinado principalmente pelo modo de preparo do lipossoma, podendo ser vesículas grandes e com múltiplas lamelas (*multilamellar vesicles* ou MLV), vesículas grandes com uma só lamela (*large unilamellar vesicles* ou LUV) ou ainda pequenas vesículas com uma só lamela (*small unilamellar vesicles* ou SUV).

A capacidade de encapsulação de uma substância em lipossomas é dada pela taxa de encapsulação. Taxas de encapsulação próximas a 100% podem ser alcançadas teoricamente com substâncias lipofílicas, mas em casos de substâncias hidrossolúveis, como no caso do fármaco de estudo, é teoricamente impossível, em virtude da coexistência dos compartimentos aquosos interno e o meio externo (FRÉZARD *et al.*, 2005).

Os lipossomas convencionais, formados de fosfolipídios e de colesterol, quando administrados por via endovenosa, são naturalmente capturados pelos macrófagos do SFM, principalmente do fígado e do baço (FRÉZARD *et al.*, 2005). A captura celular dos lipossomas é favorecida pelo processo de opsonização, caracterizado pelo revestimento do lipossoma por anticorpos ou proteínas do complemento com posterior fagocitose, que ocorre assim que os lipossomas entram em contato com os componentes do sangue.

A taxa de depuração e a biodistribuição dos lipossomas são influenciadas pela composição da vesícula, tamanho, dose e via de administração. A carga superficial dos lipossomas apresenta papel importante na taxa de encapsulação de diferentes agentes terapêuticos e na interação com as células alvo (FRÉZARD *et al.*, 2005). Geralmente, vesículas grandes e carregadas positivamente são fagocitadas mais rapidamente que aquelas com carga negativa (PATEL, 1992).

Figura 3: Representação de lipossomas convencionais e algumas possibilidades de modificação das vesículas.



Os lipossomas usados no tratamento de doenças parasitárias vêm apresentando aumento na eficácia bem como a redução da toxicidade. Na década de 1970, foram apresentados os primeiros resultados de um sistema lipossomal direcionado ao tratamento das leishmanioses (BLACK *et al.*, 1977). Alving *et al.*, (1978) relataram uma grande atividade dos antimoniais pentavalentes encapsulados em lipossomas no tratamento experimental de LV em hamsters, onde verificaram que estes foram 200 - 700 vezes mais ativos que o fármaco não encapsulado. O sucesso da terapia lipossomal deve-se ao fato de que os lipossomas são captados pelos macrófagos residentes no fígado, baço e na medula óssea, nos quais se localiza o parasito causador das leishmanioses (HEATH *et al.*, 1984).

Na década de 1990, a anfotericina B lipossomal (AmBisome[®], Gilead Sciences, Inc., CA, EUA) foi disponibilizada no mercado para o tratamento da LV humana, provocando efeitos colaterais reduzidos, e com melhores propriedades farmacocinéticas e taxas de cura elevadas, em comparação com a formulação de anfotericina B não lipossomal. A eficácia de 100% em pacientes imunocompetentes rendeu-lhe a aprovação pela Agência Americana de Alimentos e Fármacos (*Food and Drug Administration (FDA)*) como a

primeira apresentação a base de lipossomas a ser reconhecida para tratamento da LV (MEYERHOFF, 1999).

Terapias alternativas em modelos experimentais para a LV têm resultado no desenvolvimento de compostos antimoniais encapsulados em lipossomas, com aumento da eficácia e do índice terapêutico (TEMPONE *et al.*, 2004). Entretanto, apesar dos resultados promissores obtidos com os lipossomas em modelos experimentais de LV, até o presente momento nenhuma formulação lipídica de compostos antimoniais está disponível no mercado.

2.8 – Lipossomas de circulação prolongada

Lipossomas de longa duração, lipossomas estabilizados estericamente ou “furtivos” são lipossomas que possuem em sua composição um lipídio previamente conjugado a componentes hidrofílicos naturais. O polietilenoglicol (PEG) é o polímero mais utilizado no preparo de lipossomas de circulação prolongada, sendo chamados de lipossomas peguilados (SAGRISTÁ *et al.*, 2000; TORCHILIN, 2005). A camada hidrofílica superficial destes polímeros aumenta o tempo de circulação dos lipossomas evitando o reconhecimento e consequente associação com as opsoninas no plasma, desse modo, inibindo o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do SFM (ALLEN; HANSEN, 1991; LASIC, 1996). Além de prolongar o tempo de circulação dos lipossomas, o PEG presente em sua superfície evita a agregação e fusão das vesículas, aumentando a estabilidade coloidal das formulações (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006). O PEG é capaz de influenciar o potencial zeta tornando-o negativo, prevenindo a agregação das vesículas (HARASYM *et al.*, 1995).

Lipossomas peguilados são amplamente utilizados em estudos *in vivo* e também na prática clínica no tratamento de câncer. Um exemplo é a doxorrubicina encapsulada em lipossoma peguilado (Doxil[®], Caelyx[®]; Alza Pharmaceuticals, San Bruno, CA, USA) que apresenta uma meia vida de aproximadamente 55 horas em humanos (FERRARI, 2005) e é utilizada no tratamento do sarcoma de Kaposi. Azevedo *et al.*, (2014) relataram pela primeira vez que o tratamento da LV em modelo murino realizado com lipossomas peguilados contendo antimoniato de meglumina é mais eficaz que o

tratamento com lipossomas convencionais por possibilitar a permanência prolongada do Sb na circulação e maior efeito sobre a medula óssea.

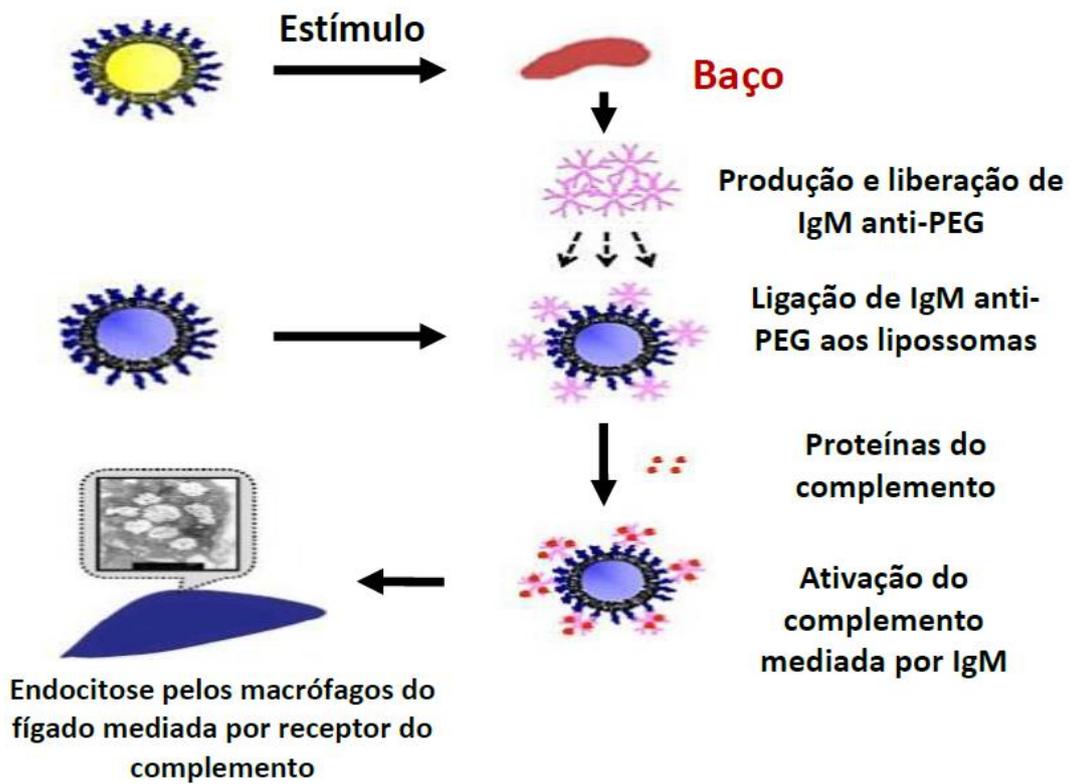
2.9 – Fenômeno de depuração sanguínea acelerada (ABC)

Dams *et al.*, (2000) demonstraram que a administração endovenosa de uma primeira dose de lipossomas peguilados vazios influencia na farmacocinética e na biodistribuição da segunda dose de lipossomas em ratos e em macacos *Rhesus*, quando há um intervalo de uma semana na aplicação. Observou-se que o tempo de circulação da segunda dose diminuiu drasticamente, acompanhado pela alta captura dos lipossomas revestidos com PEG por macrófagos do fígado e baço, o que foi denominado como fenômeno *ABC*. O mecanismo para indução desse fenômeno foi proposto posteriormente por Ishida *et al.*, (2006) que relataram que IgM anti-PEG é produzido pelas células do baço em resposta a uma dose endovenosa de lipossomas peguilados vazios e que esse anticorpo, em uma segunda dose de lipossomas peguilados, liga-se seletivamente ao PEG, provocando ativação do sistema do complemento. Este por sua vez, leva à opsonização dos lipossomas peguilados pelo fragmento C3b e, como consequência, há uma maior captura deste complexo pelas células de Kupffer.

Vários fatores influenciam na magnitude do fenômeno *ABC*, como a dose e as propriedades físico-químicas dos lipossomas inicialmente injetados, destacando a densidade e tamanho da cabeleira de PEG, carga superficial e o intervalo de tempo entre as injeções (ISHIDA *et al.*, 2006).

Diante do conhecimento prévio de que o fenômeno *ABC* pode favorecer o direcionamento dos lipossomas para os macrófagos, célula alvo da *Leishmania*, este estudo propôs avaliar a toxicidade das formulações lipossomais e a eficácia do tratamento da infecção de camundongos BALB/c por *L. infantum* com o TE em lipossomas peguilados após a ativação do fenômeno *ABC*, e a comparação deste com o tratamento realizado com lipossomas convencionais ou peguilados.

Figura 4: Mecanismo proposto para o fenômeno de depuração sanguínea acelerada. Uma dose de lipossoma peguillado vazio estimula o baço a produzir anticorpos IgM anti-PEG que ao se administrar uma segunda dose de lipossoma peguillado contendo fármaco os anticorpos previamente produzidos se ligam como opsoninas ao lipossoma, havendo ativação da via clássica do complemento e subsequente endocitose do lipossoma carreando o fármaco pelos macrófagos do fígado. Adaptado de Abu Lila; Kiwada; Ishida, 2013.



3 – OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade das formulações lipossomais contendo tártaro emético e a eficácia das formulações no tratamento da leishmaniose visceral murina após ativação do fenômeno *ABC*.

3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 **ETAPA 1:** Obter e caracterizar as formulações lipossomais; Avaliar a atividade hemolítica das formulações contendo o TE e vazias *in vitro* e correlacionar com os níveis de hemácias e hemoglobina de camundongos não infectados tratados;

3.1.2 **ETAPA 2:** Avaliar a toxicidade do tratamento em camundongos BALB/c sadios e a influência do fenômeno *ABC* sobre o direcionamento do tártaro emético lipossomal para o fígado e baço.

3.1.3 **ETAPA 3:** Avaliar a eficácia do tratamento em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* e caracterizar histologicamente as alterações ocorridas no fígado e no baço.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material

Os fosfolipídios diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), distearoil-fosfatidiletanolamina acoplado a um polímero de etilenoglicol (DSPE-PEG 2000), foram obtidos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha), o colesterol (CHOL) foi obtido da Dishman (Netherlands B. V) e o tártaro emético (TE, C₈H₄K₂O₁₂Sb₂.3H₂O) da Sigma-Aldrich (Estados Unidos).

4.2- Preparo dos lipossomas

As formulações testadas neste trabalho foram preparadas com o auxílio do Prof. José Mário Barichello e da Prof^a. Neila Márcia da Silva Barcellos, ambos do Departamento de Farmácia da Escola de Farmácia de Ouro Preto.

Para o desenvolvimento do presente estudo, foram obtidas 4 formulações lipossomais, conforme descrito abaixo:

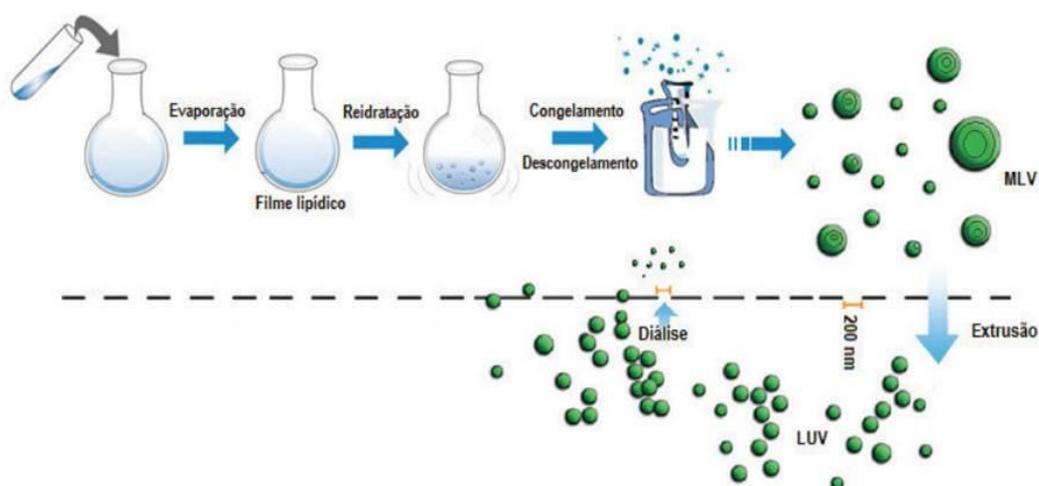
- ✚ Lipossoma 1: Lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg + TE);
- ✚ Lipossoma 2: Lipossomas peguilados sem fármaco (Lpeg vazio);
- ✚ Lipossoma 3: Lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc + TE);
- ✚ Lipossoma 4: Lipossomas convencionais sem fármaco (Lc vazio).

Os lipossomas convencionais de TE utilizados para a realização deste trabalho foram compostos pelos lipídios distearoilfosfatidilcolina (DSPC) – Sigma, USA e colesterol (CHOL) – Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha) na proporção adotada de DSPC/CHOL (5:4) em um total de lipídios de 120g/L. Os lipossomas peguilados de TE são compostos pelos lipídios DSPC, CHOL e distearoil-fosfatidiletanolamina acoplado a um polímero de etilenoglicol (DSPE-PEG) na relação molar 5:4:0,3, respectivamente, em um total de lipídios de 76,9 g/L. A obtenção de lipossomas unilamelares foi feita pela metodologia de congelamento/descongelamento (MAYER; HOPE, 1985) com subsequente extrusão (NAYAR; HOPE; CULLIS, 1989).

Os lipídios foram solubilizados em clorofórmio e a solução transferida para um balão de vidro de fundo redondo. O filme lipídico foi formado pela

evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório acoplado a banho à temperatura de 60°C à pressão reduzida. O filme lipídico foi hidratado com PBS pH 7,2 ou solução de tártaro emético (80,0g/L) (TE, $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$, obtido da Sigma – USA) isosmótica. Posteriormente, foram realizados 10 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho a 60°C) a fim de se encapsular o TE. As suspensões de lipossomas multilamelares foram filtradas em extrusora através de membrana de policarbonato 0,2 μm sobre pressão 250 psi/60°C. A suspensão de lipossomas unilamelares contendo TE foi colocada em membrana de celulose e dialisada em PBS - pH 7,2, por 24h, sendo o PBS substituído a cada 12h. Após diálise, alíquotas foram coletadas e a quantidade de TE encapsulada foi quantificada para se determinar a eficiência de encapsulamento do princípio ativo.

Figura 5: Metodologia de preparo das formulações lipossomais (Vidal, 2009).



4.3– Caracterização dos lipossomas

O tamanho médio, índice de polidispersão, e potencial zeta dos lipossomas foram avaliados por meio de técnica de espectroscopia de correlação de fótons em aparelho Zetasizer (Nano Series – Nano ZS - Malvern), disponibilizado pelo Laboratório de Multiusuários do CiPharma. Para tanto, as preparações contendo TE ou PBS foram diluídas na proporção de 1:250 em água ultrapura para determinação do tamanho médio e do índice de polidispersão e em PBS (1:250) para leitura do potencial zeta, de acordo com

as especificações do aparelho. As aferições de distribuição de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta da população foram avaliadas efetuando-se leitura de três amostras independentes em triplicata.

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:

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

4.3 – Determinação da taxa de encapsulamento de Sb nos lipossomas

A presente dosagem foi realizada em colaboração com o laboratório de Nanotecnologia e sistemas nanoestruturados da UFMG, sobre orientação do Prof. Dr. Frederic Frézard.

A taxa de encapsulação de Sb nos lipossomas foi realizada por meio de digestão ácida das amostras. Para isso, 10µL de cada amostra foram pipetados e transferidos para um tubo Pyrex[®] ao qual foi adicionado 1mL de solução de ácido nítrico concentrado (65%, v:v). Os tubos foram então colocados em um bloco digestor (modelo MA 38 4004, Marconi, Brasil) e mantidos a 70°C por 45 minutos. Após este tempo, os tubos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente e 450 µL de peróxido de hidrogênio foram adicionados. Novamente, as amostras foram incubadas a 70°C por 30 minutos no bloco digestor. Após resfriamento, as amostras foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com ácido nítrico 0,2%. O digerido foi então armazenado em tubos de polipropileno de 15 mL até o momento da determinação analítica do metal.

A quantidade de Sb nas amostras foi determinada por espectroscopia de absorção atômica utilizando um espectrômetro modelo AA600 da Perkin Elmer[®] equipado com forno de grafite e auto amostrador (Analyst AA600, Perkin Elmer, Inc., MA, USA). As absorbâncias foram medidas no comprimento de onda 217,6 nm com largura de fenda de 0,7 nm e 15µL de volume de

amostra. Como modificador de matriz para a análise do Sb foram utilizados 5µL de uma solução contendo 120 µL de nitrato de paládio (Pd(NO₃)₂) (10g/L, Perkin Elmer, EUA), 72 µL de nitrato de magnésio (10g/L, Perkin Elmer, EUA) (Mg(NO₃)₂) e 1 mL de HNO₃ 0,2%. A determinação da taxa de encapsulação do Sb nos diferentes lipossomas foi realizada a partir da quantidade de Sb presente nas amostras digeridas previamente.

4.4 – Ensaio de atividade hemolítica

O efeito das formulações de lipossomas convencionais e peguilladas contendo o TE e do TE sobre as hemácias foi avaliado seguindo a metodologia descrita por LÖFGREN *et al.*, (2008) e por VALADARES *et al.*, (2011). Resumidamente, sangue humano O⁺ foi coletado em tubo com EDTA e a seguir distribuído em eppendorfs de 1,5ml, em diferentes proporções de água destilada e PBS. A seguir adicionou-se diferentes concentrações das concentrações de lipossomas (0, 50, 100, 150, 200, 250µg/ml) e de tártaro emético (150µg/ml). A metodologia se baseia na determinação quantitativa colorimétrica da hemoglobina liberada após exposição de sangue total aos lipossomas. As amostras sanguíneas foram coletadas, após a aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da instituição sob o número 095970/2015 após a submissão do trabalho na Plataforma Brasil (Anexo I) e após o consentimento dos voluntários. As amostras foram utilizadas somente quando atendessem os critérios estabelecidos no questionário de entrevista aplicado a cada voluntário (Anexo II). O resultado da hemoglobina presente na amostra resultante da exposição de sangue total ao PBS 1x e à água destilada correspondem, respectivamente, a ausência e 100% de hemólise.

4.5 – Animais

Neste trabalho, foram utilizados 144 camundongos machos da linhagem BALB/c, com idade entre 6 a 8 semanas, obtidos no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico alocadas em estantes ventiladas no setor de

experimentação em isogênicos com ração padrão e água *ad libitum* devidamente autoclavadas.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto com o número 2013/39 (Anexo III).

4.6 – Cepa de *Leishmania infantum*

Para a realização desse trabalho, utilizou-se a cepa C46 (MCAN/BR/2008/OP46) 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 e pelo Pós-doutorando Dr. Rodrigo Dian, ambos do Laboratório de Imunopatologia - NUPEB – UFOP.

4.7 – Manutenção da cepa C46 e curva de crescimento

Com o objetivo de manter a cepa C46 e determinar o dia em que os parasitos se encontravam infectantes – promastigotas metacíclicas a curva de crescimento foi realizada. 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), 2mM de L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) 100U/mL de penicilina G (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), pH 6,5 (Grace 10% de SFB), à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Para a obtenção da curva de crescimento da cepa C46, iniciou-se nova cultura com 1×10^6 parasitos/mL, mantida nas mesmas condições anteriores, e esta foi quantificada diariamente, em câmara de Neubauer após diluição em formalina 4% pelo período de 10 dias.

4.8 – Infecção dos camundongos BALB/c com *Leishmania infantum*

Camundongos BALB/c machos foram inoculados com 1×10^7 promastigotas do parasito na veia da cauda. Para isso, preparou-se o inoculo a partir de uma cultura de parasitos em início de fase estacionária. Os parasitos

foram coletados por centrifugação (1540 x g por 10 min a 4°C) e lavados três vezes em PBS. Para o preparo do inóculo na concentração de 1×10^7 parasitos/100µL, a quantidade de parasitos foi determinada em câmara de Neubauer.

Após a inoculação dos parasitos, os animais foram mantidos no setor de experimentação do CCA, acomodados em gaiolas, mantidos em temperatura entre 21 e 25°C em ciclo de claro e escuro e água e ração *ad libitum*.

4.9 – Coleta de sangue e eritograma

A eutanásia dos animais infectados e não infectados foi realizada 14 dias após o tratamento e o sangue dos animais foi coletado através de secção da aorta abdominal com o auxílio de ponteira e armazenado em tubos com EDTA. A análise da série vermelha do sangue dos animais não infectados foi realizada no Laboratório de Imunopatologia do NUPEB – UFOP, pelo aparelho *Auto Hematology Analyzer* – BC-2800Vet, manuseado pela farmacêutica Lúcia Gomes de Araújo.

4.10 – Determinação da concentração de antimônio no fígado e no baço

Os tecidos foram submetidos a uma digestão ácida, conforme SCHETTINI *et al.*, (2006). O fígado e o baço dos animais foram coletados e triturados em um macerador de órgãos (SPELL GLASS®). Uma alíquota do triturado de tecidos de aproximadamente 1g foi pesada em tubo plástico de 15 mL juntamente com 2 mL de PBS sendo a mistura resultante homogeneizada. A mistura homogeneizada, aproximadamente 200 mg, foi alíquotada em tubos de ensaio apropriados para digestão. Em seguida, foram acrescentados aos tubos 2 mL de HNO₃ 65% (v:v) e a mistura resultante foi aquecida a 70°C por 2 horas em um bloco digestor (MA 400, Marconi, São Paulo, Brasil). Após este período, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente, seguido da adição de 400 µL de H₂O₂ 30% (v:v). Novamente, os tubos foram aquecidos por mais 2 horas a 70°C. Por fim, o conteúdo do tubo foi transferido de forma quantitativa para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com solução de HNO₃ a 0,2%.

O equipamento utilizado para a dosagem de Sb foi um espectrômetro de absorção atômica, modelo AA600 da Perkin Elmer[®] equipado com forno de grafite e auto amostrador. Foi utilizada lâmpada de EDL (*Electrodeless Discharge Lamps*) de antimônio, que operou a 30 mA, e o argônio foi usado como gás de purga.

A técnica de absorção atômica permite a quantificação do metal em concentrações mínimas de amostras uma vez que o volume requerido de amostra varia de 5 a 100 µL. Também são vantagens do método a sua alta precisão, exatidão e simplicidade.

4.11 – Análises histológicas

As análises histológicas foram realizadas em colaboração com o professor Dr. Wanderson Lima, no Laboratório de Morfopatologia – DECBI/NUPEB/UFOP. Fígado, baço, coração e rins foram coletados após eutanásia, fixados em formol tamponado 4% por 24 horas, no mínimo, e processados rotineiramente para inclusão em parafina. Os cortes histológicos de aproximadamente quatro micrômetros foram corados em Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histopatológica. As alterações histopatológicas avaliadas no fígado foram inflamação, granuloma, degenerações, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, hemossiderose e congestão, já o baço foi avaliado quanto a inflamação, hipertrofia e hiperplasia de polpa branca e vermelha, hemossiderose, congestão e granuloma. As lesões avaliadas foram as mesmas analisadas por Souza *et al.*, (2014). A arquitetura dos tecidos do coração e dos rins e as principais lesões que acometem estes órgãos também foram avaliadas. As avaliações histopatológicas foram realizadas de maneira qualitativa em microscopia óptica e o registro fotográfico realizado através da digitalização de imagens no microscópio Leica DM 5000 e programa Leica Applications Suite.

4.12 – Determinação da carga parasitária no baço, fígado e medula óssea

A quantificação de parasitos foi realizada utilizando a técnica de diluição limitante descrita por Titus *et al.*, (1985) e modificada por Marques-da-Silva *et*

al., (2005). A técnica de diluição limitante é um exame parasitológico que permite estimar o número de parasitos viáveis presentes em um determinado órgão.

Sobre condições assépticas, os animais, postos em decúbito dorsal, tiveram sua cavidade abdominal aberta com auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas. Um fragmento do fígado (60 - 100mg), um fragmento de baço (60 – 140mg) e uma das patas traseiras foram coletados de cada animal. Os fragmentos de fígado e baço assim obtidos tiveram sua massa determinada 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 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina e 100 U/mL de penicilina G. A porção restante do fígado e do baço foi coletada para determinação da massa total do órgão e para a confecção das lâminas histológicas. Os fragmentos de fígado e de baço foram então macerados, individualmente, com o auxílio de um macerador de órgãos (SPELL GLASS[®]) 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 completados com meio de lavagem até o volume de 10 mL e então submetidos à centrifugação a 500 rpm/1 min/ 4°C para a determinação da carga parasitária.

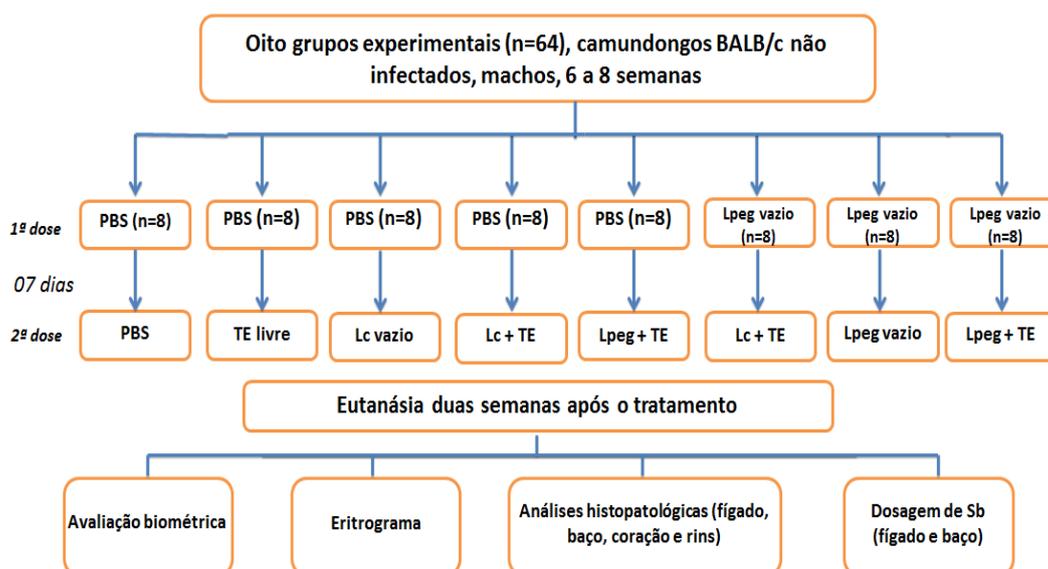
Para a determinação da carga parasitária na medula óssea, retirou-se o fêmur e a tíbia da pata traseira de cada animal e imergiu-se os ossos em álcool etílico 70% por 2 minutos, seguido por imersão em Meio de Lavagem. Foram cortadas as duas epífises e injetou-se Meio de Lavagem pelas extremidades, até completa remoção do tecido. O material resultante do processamento de fragmentos de fígado, baço e medula óssea foi centrifugado (3000 rpm/ 10 min 4°C) e o precipitado formado foi ressuscitado em 500µL de meio Grace 10% de SFB. Plaqueou-se o material obtido, em duplicata, em placas de 96 poços de fundo chato, estéreis, seguindo diluições sucessivas 1:5 (v:v) em meio Grace 10% de SFB. A placa foi mantida em estufa a 25°C e examinada após 14 dias em microscópio invertido para a detecção de parasitos, observando-se o crescimento ao longo da diluição (1:5 – v:v). Considerou-se como 3 parasitos quando observou-se crescimento somente até o primeiro poço da diluição.

A diluição mais elevada em que foi observada pelo menos uma forma promastigota foi considerada a diluição limite e utilizada no cálculo da carga parasitária (RODRIGUES *et al.*, 2009). A carga parasitária foi expressa como número de parasitos por órgão.

4.13 – ETAPA 2:

Nessa etapa, foi avaliado o efeito dos diferentes tratamentos propostos no fígado, baço, coração e rins de camundongos BALB/c não infectados e avaliado o direcionamento do Sb para o fígado e o baço mediante indução ou não do fenômeno ABC. Para isso, avaliou-se: a massa corporal dos animais, as alterações histológicas decorrentes do tratamento com o antimônio trivalente livre ou encapsulado em lipossomas, a quantificação do Sb no fígado e no baço e a análise do eritrograma dos animais. O experimento deu-se pelo esquema representativo da figura 6:

Figura 6. Delineamento experimental dos tratamentos e indução do fenômeno ABC. TE livre = tártaro emético livre; Lc vazio = lipossomas convencionais sem fármaco; Lc + TE = lipossomas convencionais com tártaro emético; Lpeg + TE = lipossomas peguilados com tártaro emético; Lpeg vazio = lipossomas peguilados sem fármaco.



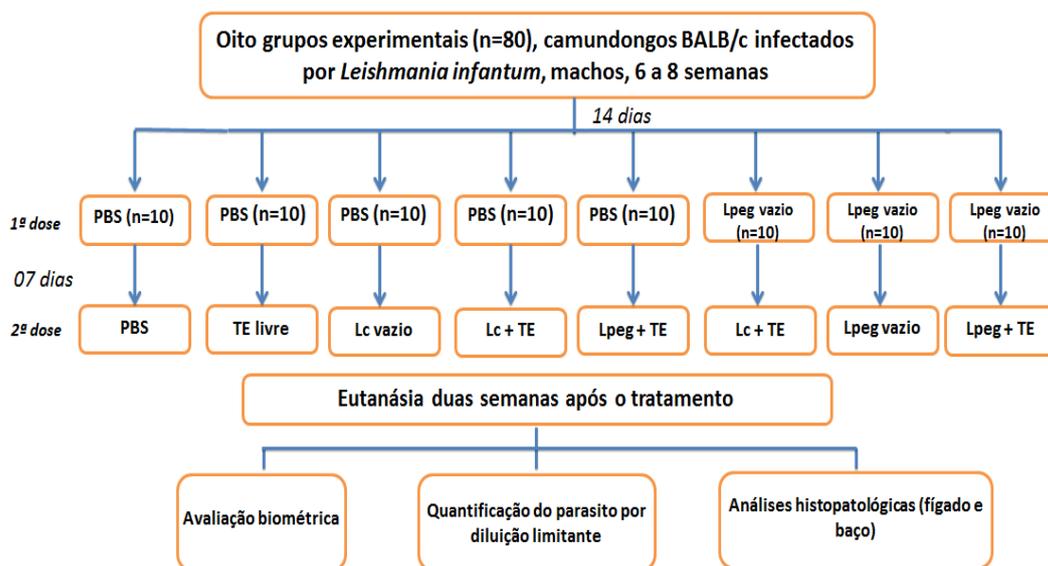
4.14 – ETAPA 3:

Para avaliar a atividade leishmanicida do tártaro livre ou em formulações lipossomais peguiladas ou convencionais, na presença ou não do fenômeno ABC, utilizou-se camundongos BALB/c, machos com idade entre 6 e 8 semanas, divididos em 8 grupos experimentais (n=10). Os animais foram inoculados com a cepa C46 de *L. infantum* conforme descrito no item 4.8. Duas semanas após a infecção, estimulou-se o fenômeno ABC nos animais do grupo, G6, G7 e G8 (tratados com lipossomas peguilados vazios). Nos grupos em que o fenômeno não foi estimulado, foi administrado o mesmo volume de PBS também pela veia da cauda. A dose de lipídios para indução do fenômeno ABC foi calculada segundo Lila; Kiwada; Ishida, 2013.

Uma semana após o estímulo do fenômeno ABC, os animais foram tratados, por via endovenosa, de acordo com o seguinte protocolo: PBS; tártaro emético livre (TE) – 12 mg/kg de SbIII; lipossomas vazios; lipossomas convencionais contendo tártaro emético – 12 mg/kg de SbIII; lipossomas peguilados de tártaro emético – 12 mg/kg de SbIII; lipossomas convencionais de tártaro emético – 12 mg/kg de SbIII; lipossomas peguilados vazios e lipossomas peguilados de tártaro emético – 12 mg/kg de SbIII.

Os animais foram eutanasiados 14 dias após o tratamento 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).

Figura 7: Delineamento experimental do experimento de indução do fenômeno ABC, e da avaliação da atividade leishmanicida dos tratamentos propostos aos camundongos BALB/c. TE livre = tártaro emético livre; Lc vazio = lipossomas convencionais sem fármaco; Lc + TE = lipossomas convencionais com tártaro emético; Lpeg + TE = lipossomas peguilados com tártaro emético; Lpeg vazio = lipossomas peguilados sem fármaco.



4.15 – Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos a teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que passaram no teste de normalidade foram analisados pelo One Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos em média \pm desvio padrão e os dados que não passaram no teste de normalidade, foram analisados pelo Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's e expressos pela mediana, valor máximo e valor mínimo. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

ETAPA 1:

5.1 – Caracterização das formulações lipossomais

Os lipossomas foram avaliados em relação ao tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta por meio da técnica de espectroscopia de correlação de fótons. A tabela 1 apresenta os valores de diâmetro médio das vesículas lipídicas e a distribuição do tamanho da população. Os lipossomas apresentaram tamanho médio entorno de 200nm. O baixo índice de polidispersão obtido após a extrusão indicou homogeneidade de tamanho médio das partículas. As amostras em questão são consideradas monodispersas, uma vez que seu IP é inferior a 0,3 (HUNTER; FRISKEN, 1998). Assim, os valores obtidos confirmam que a extrusão da formulação de lipossomas multilamelares através de membrana de policarbonato de 0,2 μm sobre pressão 250 psi/60°C pode ser considerada como uma técnica confiável para a calibração do tamanho dos lipossomas.

A carga da superfície dos lipossomas pode ser modificada pela introdução de lipídios neutros, carregados positivamente ou negativamente na bicamada lipídica. Em geral, a presença de uma carga eletrostática na superfície dos lipossomas promove a interação com biomoléculas, como proteínas do complemento e anticorpos, fazendo com que eles sejam removidos mais rapidamente da circulação do que os lipossomas neutros (Laverman *et al.*, 1999). As vesículas lipossomais foram constituídas por distearoilfosfatidilcolina (DSPC), um fosfolípido zwitteriônico (neutro), pois o grupo fosfato apresenta carga negativa em pH 7,0 e o grupo colina é carregado positivamente. Outro fosfolípido utilizado nas formulações peguiladas foi o distearoil-fosfatidiletanolamina acoplado ao polímero de polietilenoglicol que possui carga negativa. A hidrofilia conferida à superfície dos lipossomas peguilados prolonga a meia-vida em meio biológico de poucos minutos, (lipossomas convencionais) para várias horas, visto que a incorporação de componentes hidrofílicos, como o PEG, retarda o reconhecimento e captura dos lipossomas furtivos pelo SFM (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

A presença da carga negativa na superfície das vesículas também interfere diretamente com a eficiência de encapsulação. Assim, lipossomas carregados negativamente encapsulam volumes maiores de antimoniais que lipossomas carregados positivamente (BLACK *et al.*, 1977).

Os resultados de encapsulação do SbIII (Tabela 2) observados se assemelham aos resultados encontrados na literatura, os quais variam de 6,5 a 15,0% para formulações convencionais (DE MELO *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2014) e de 6,5 – 14,5% para formulações peguiladas (DE MELO *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2010; LÍCIO, 2013).

Tabela 1: Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta da população de lipossomas de três preparações independentes analisadas em triplicata. Valores expressos em média \pm DP.

	<i>Diâmetro médio (nm)</i>	<i>Índice de Polidispersão</i>	<i>Potencial Zeta</i>
<i>Lipossoma peguilado + tártaro emético</i>	177,1 \pm 0,9	0,07 \pm 0,01	-2,59 \pm 0,3
	184,8 \pm 0,5	0,15 \pm 0,07	-3,79 \pm 0,3
	182,1 \pm 1,3	0,09 \pm 0,01	-3,59 \pm 0,9
<i>Lipossoma peguilado vazio</i>	191,6 \pm 1,6	0,06 \pm 0,01	-3,42 \pm 0,8
	188,9 \pm 1,79	0,07 \pm 0,01	-4,87 \pm 0,9
	180,4 \pm 1,0	0,087 \pm 0,04	-5,82 \pm 2,1
<i>Lipossoma convencional + tártaro emético</i>	197,3 \pm 1,0	0,09 \pm 0,03	-17,2 \pm 0,7
	207,6 \pm 1,8	0,14 \pm 0,04	-12,9 \pm 1,7
	206,1 \pm 0,6	0,11 \pm 0,03	-13,8 \pm 0,8
<i>Lipossoma convencional vazio</i>	207,3 \pm 0,4	0,09 \pm 0,01	-12,7 \pm 0,8
	219,8 \pm 1,2	0,17 \pm 0,01	-11,4 \pm 0,2
	211,7 \pm 0,5	0,13 \pm 0,03	-10,2 \pm 0,9

Tabela 2: Porcentagem de encapsulação da população de lipossomas de três preparações independentes analisadas.

	<i>Porcentagem de encapsulação</i>		
<i>Lipossoma+ PEG+SbIII</i>	14%	14%	13%
<i>Lipossoma+ SbIII</i>	14%	13%	13,5%

5.2 – Avaliação da atividade hemolítica das formulações lipossomais vazias e contendo tártaro emético e do fármaco livre

Os resultados obtidos no ensaio de atividade hemolítica, apresentados na figura 8, demonstram baixa taxa de hemólise após a incubação com concentração única de TE livre (150µg/ml) e com diferentes concentrações das formulações lipossomais contendo o TE ou vazias com sangue total. O grau de hemólise foi comparado a uma amostra de sangue total incubada apenas com PBS, utilizada como controle negativo, já que o PBS não induz a lise das células por garantir isotonicidade do meio. O resultado de cada teste também foi comparado a amostras incubadas com água destilada, utilizada como indutora de hemólise (100% de hemólise).

As formulações lipossomais vazias apresentaram atividade hemolítica, porém, menor que as formulações contendo TE e que o fármaco em sua forma livre. O TE livre e os quatro lipossomas utilizados neste trabalho provocaram taxa de hemólise inferior a 15%, o que demonstra que, em todas as concentrações testadas *in vitro*, as formulações e o TE livre poderiam ser utilizados em estudos *in vivo* segundo Dobrovolskaia; Germolec; Weaver (2009). Este estudo relatou que nanopartículas que induzem taxa de hemólise entre um (01) e 25% *in vitro* podem ser testadas *in vivo*. Além disso, para se analisar o efeito das formulações e do TE livre sobre as hemácias *in vivo*, foi determinada a contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina de animais não infectados e tratados com as diferentes formulações, não se observando toxicidade sobre as hemácias e hemoglobina *in vivo* (Figura 9).

Figura 8: Porcentagem de hemólise provocada pelas formulações lipossomais e pelo fármaco em sua forma livre. Lpeg+TE = Lipossomas peguilados + tártaro emético, Lpeg vazio = Lipossomas peguilados vazios, Lc+TE = Lipossomas convencionais + tártaro emético, Lc vazio = Lipossoma convencional vazio, TE livre = tártaro emético livre. One Way ANOVA. $p < 0,05$. (n=5).

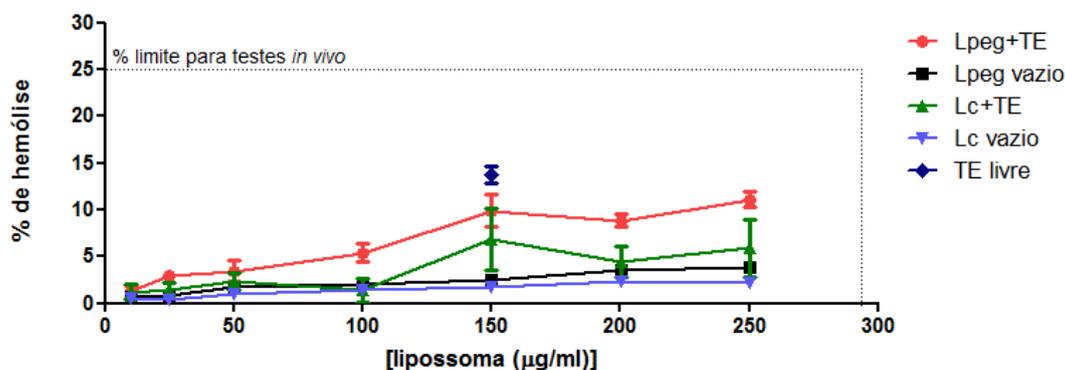
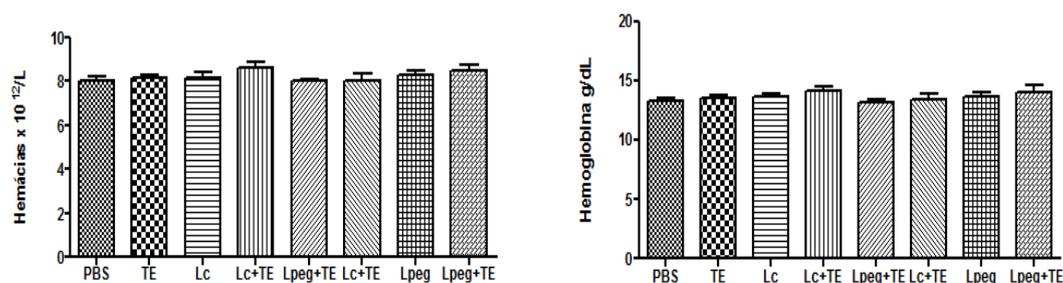


Figura 9: Número de hemácias e concentração de hemoglobina de camundongos BALB/c não infectados submetidos a diferentes tratamentos. Sem indução do fenômeno ABC: Grupo controle (PBS); Animais tratados com tártaro emético livre (TE); Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc); Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Indução do Fenômeno ABC: Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados vazios (Lpeg) e Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). One Way ANOVA. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. (n=8).



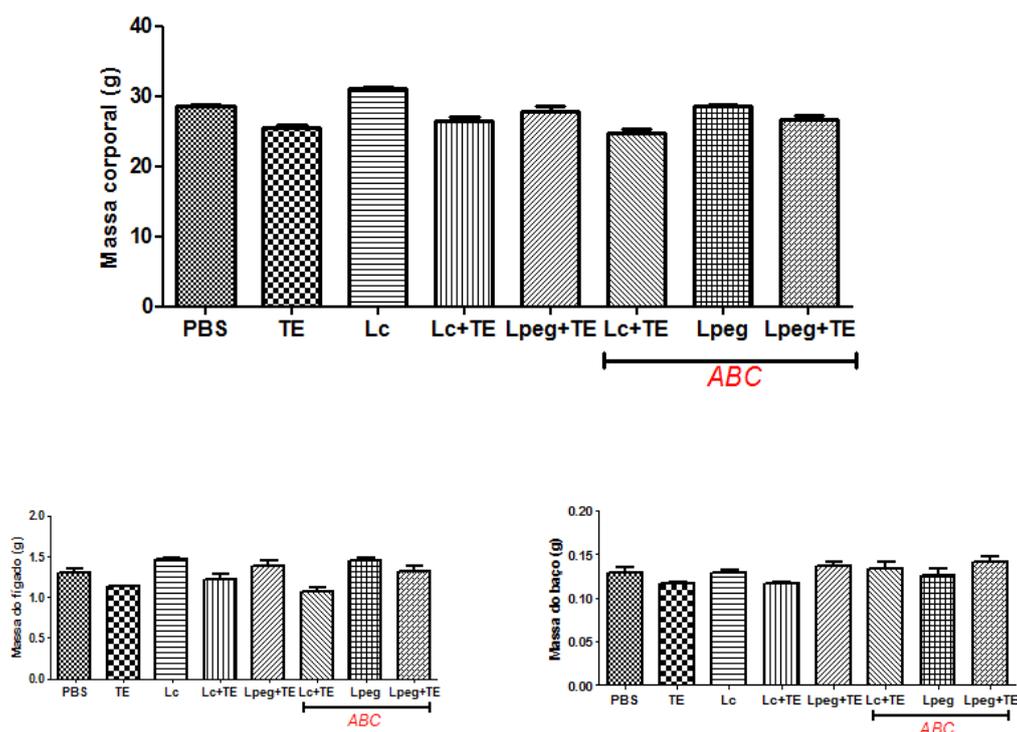
ETAPA 2:

Esta etapa foi realizada para se avaliar a toxicidade dos diferentes tratamentos propostos em camundongos BALB/c não infectados e a influência do fenômeno ABC sobre o direcionamento dos lipossomas para o fígado e o baço.

5.3 - Avaliação da massa corporal, do fígado e do baço de camundongos não infectados e tratados

A redução da massa corporal de animais é um parâmetro simples de avaliação de toxicidade após a exposição a agentes lesivos (THANABHORN *et al.*, 2006). Diante disso, foi analisada a massa corporal bem como do fígado e do baço dos animais não infectados e tratados conforme o esquema metodológico previamente apresentado na Figura 6. Após os diversos tratamentos, utilizando a concentração de 12mg/kg de TE, na presença ou não do fenômeno ABC, não foram observadas modificações na massa corporal ou dos órgãos dos animais (Figura 10). Dieter, (1992) também não observou alterações na massa corporal de camundongos B6C3F1 após 16 dias de administração intraperitoneal de diferentes doses (0, 6, 13, 25, 50, or 100 mg/kg) de antimônio trivalente.

Figura 10. Massa corporal, do fígado e do baço de camundongos BALB/c não infectados e submetidos aos diferentes tratamentos. Grupos sem indução do fenômeno ABC: Grupo controle (PBS); Animais tratados com tártaro emético livre (TE); Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc); Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do Fenômeno ABC: Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados vazios (Lpeg) e Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). One Way ANOVA. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. (n=8).



5.4 – Análises histopatológicas dos tecidos do fígado, baço, coração e rins de animais não infectados e tratados

As avaliações histopatológicas do fígado, baço, coração e rins de camundongos não infectados submetidos aos diferentes tratamentos propostos teve o objetivo de avaliar as possíveis alterações celulares e intersticiais relacionadas aos tratamentos.

A utilização de lipossomas 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 antimônio trivalente a ser administrada e, conseqüentemente, reduzir o impacto deste semimetal no tecido renal.

De maneira geral, os animais não infectados e tratados apresentaram quadro histológico hepático compatível à normalidade. As lesões, quando encontradas, foram sempre de maneira discreta e focal, destacando-se a hiperemia e a presença de pequenos granulomas, presentes em todos os grupos. A arquitetura hepática semelhante à normalidade e as principais alterações encontradas estão representadas na Figura 17 que se encontra na página 68.

A hiperemia não é só um processo de caráter patológico, ela também ocorre em situações normais e se caracteriza pelo aumento do fluxo sanguíneo intravascular em um tecido. A observação tecidual da hiperemia pode ser associada a ausência de perfusão durante o processo de necropsia. Devido a esta falha metodológica a observação intravascular das hemácias pode ocorrer até mesmo em tecidos sadios.

A presença de granulomas hepáticos pequenos e de maneira focal foi um achado frequente nos animais não infectados. Esta lesão, embora esperada em animais infectados, pode também ocorrer em animais não infectados, podendo estar associada a processos fisiopatológicos decorrentes do curso de vida do animal, indicando que esta lesão, embora fundamental na infecção por *Leishmania*, ocorre também em outros processos.

Estudos anteriores em nosso laboratório evidenciaram que a administração de TE encapsulado em lipossomas convencionais (9mg/Kg) por via intraperitoneal não foi tóxica aos tecidos hepáticos, cardíacos e renais em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*. (CASTRO *et al.*, 2014).

Ao se analisar o baço, todos os grupos experimentais apresentaram quadro histológico compatível com a normalidade. A arquitetura esplênica preservada dos animais não infectados e submetidos aos diferentes tratamentos foi retratada na Figura 18 que se encontra na página 63.

Os efeitos do Sb nos tecidos cardíacos devem-se ao contato deste semimetal diretamente com os mesmos. A utilização de compostos de antimônio no tratamento de pacientes com leishmaniose leva a importantes alterações cardiovasculares observáveis pela realização de eletrocardiograma (LEITE *et al.*, 2007; VIDAL *et al.*, 2010).

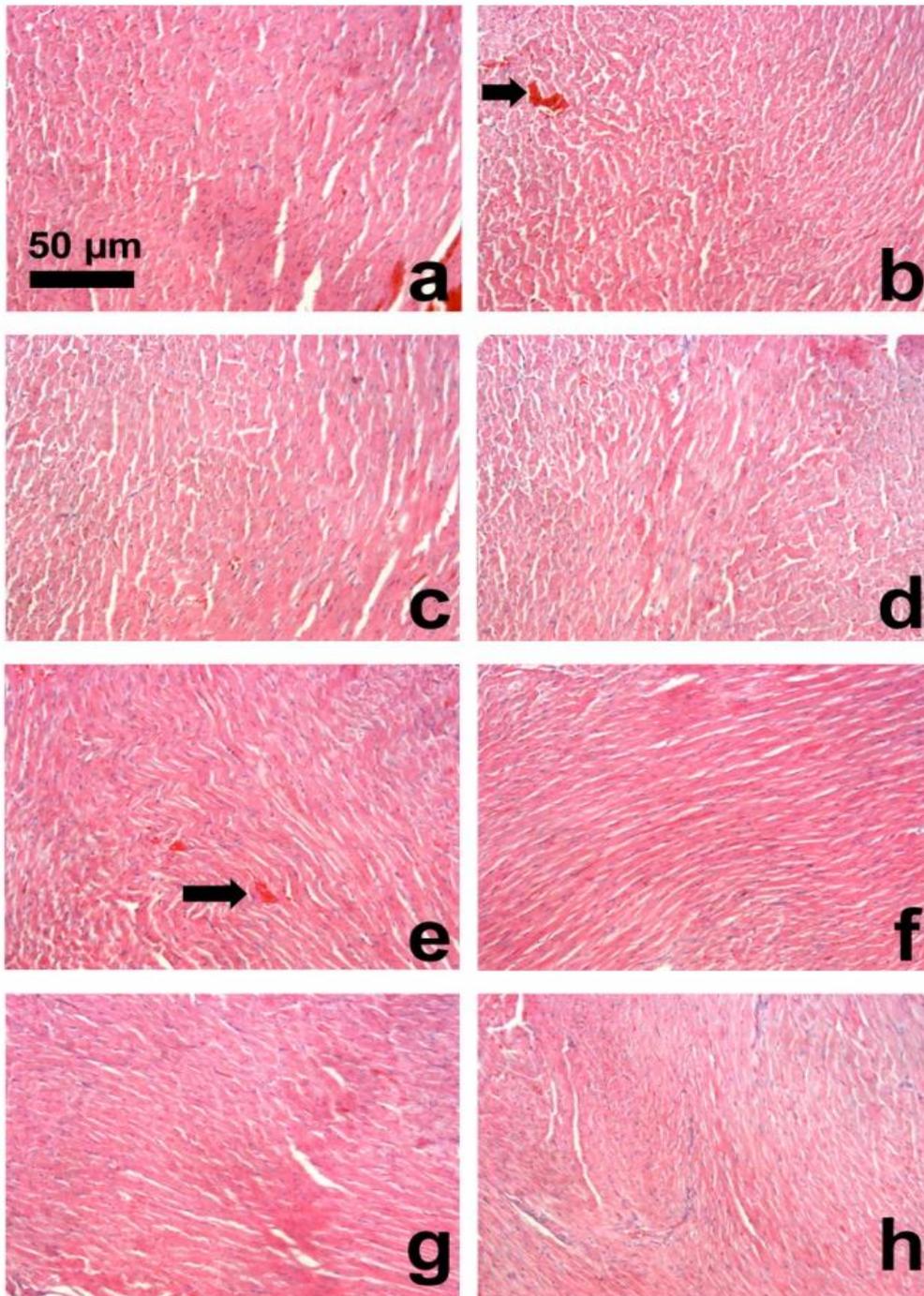
O coração dos camundongos não infectados e submetidos aos diferentes tratamentos apresentou arquitetura normal, com ausência de inflamação ou de áreas de morte tecidual. A única lesão encontrada em todos os grupos foi a hiperemia, que mais uma vez pode estar associada à ausência de perfusão dos animais durante a eutanásia.

Reis (2010), avaliou a cardiotoxicidade do SbIII em ratos Wistar adotando um protocolo agudo com administração de 17mg de SbIII/kg e de 650mg/kg ácido ascórbico (AA). Este trabalho mostrou que lipossomas peguados de SbIII associados ou não ao AA foram capazes de reduzir a cardiotoxicidade do SbIII. Maciel *et al.*, (2010) também mostraram a redução da cardiotoxicidade pela administração do tártaro emético lipossomal em altas concentrações, em comparação com os resultados obtidos pela administração do fármaco livre.

Castro *et al.*, (2014), realizaram análises histopatológicas dos tecidos cardíacos de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e tratados com TE livre (9mg/kg), TE + AA, TE lipossomal e lipossomas contendo TE e AA e não observou degeneração celular e/ou arquitetural em nenhum dos grupos avaliados, assemelhando-se aos achados do nosso trabalho.

A arquitetura preservada dos tecidos cardíacos e a principal alteração encontrada, presente em todos os grupos, estão representadas na Figura 11.

Figura 11: Fotomicrografias representativas do padrão histopatológico do coração de animais não infectados e tratados com as diferentes formulações, corados com hematoxilina e eosina. Grupos sem indução do Fenômeno ABC: **a** - Grupo controle (PBS); **b** - Animais tratados com tártaro emético livre (TE); **c** - Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc vazio); **d** - Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); **e** - Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do Fenômeno ABC: **f** - Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); **g** - Tratados com lipossomas peguilados vazios (Lpeg vazio) e **h** - Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). Setas pretas - Discreta hiperemia. Aumento 220x.

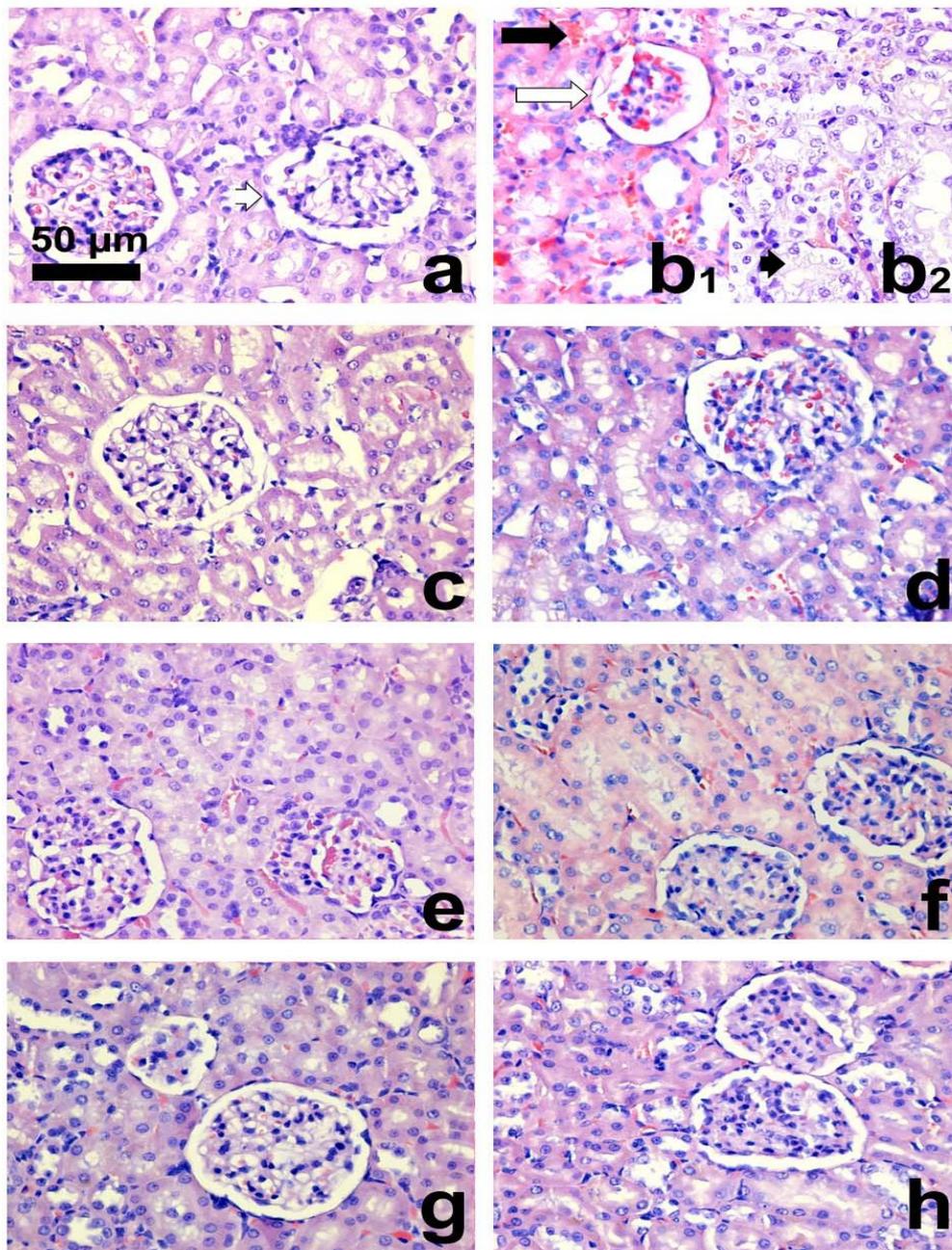


Os animais tratados com 12mg/kg de TE livre apresentaram além da hiperemia lesões como degeneração tubular, hemorragia, inflamação e esclerose glomerular, já os animais dos demais grupos, tratados com as formulações lipossomais apresentaram aspecto histopatológico renal normal e hiperemia, que mais uma vez aparece como processo fisiológico.

Castro *et al.*, (2014) não observaram alterações na morfologia glomerular das células mesangiais ou glomerulonefrite evidente, bem como presença de degeneração em nenhum dos grupos avaliados ao tratar camundongos BALB/c por via intraperitoneal com TE na concentração de 9mg/kg.

A arquitetura dos tecidos renais e as principais alterações encontradas estão representadas na Figura 12.

Figura 12: Fotomicrografias representativas do padrão histopatológico dos rins de animais não infectados e tratados com as diferentes formulações, corados com hematoxilina e eosina. Grupos sem indução do Fenômeno ABC: **a** - Grupo controle (PBS); **b1** e **b2** - Animais tratados com tártaro emético livre (TE); **c** - Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc vazio); **d** - Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); **e** - Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do Fenômeno ABC: **f** - Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); **g** - Tratados com lipossomas peguilados vazios (Lpeg vazio) e **h** - Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). Seta preta - Discreta hiperemia. Seta branca - esclerose glomerular. Cabeça de seta branca - glomérulo normal. Cabeça de seta preta - degeneração tubular. Aumento 440x.



5.5 - Determinação da concentração de antimônio trivalente no fígado e no baço de camundongos não infectados

Essa análise foi realizada com o objetivo de avaliar a concentração de Sb direcionada para o fígado e para o baço de camundongos não infectados, mediante os diferentes tratamentos propostos.

A distribuição do Sb após administração endovenosa é determinada por sua afinidade pelas células, principalmente do fígado, rins, ossos, e órgãos altamente vascularizados. Órgãos ricos em células do SFM também apresentam maior retenção do Sb (STEMMER, 1976).

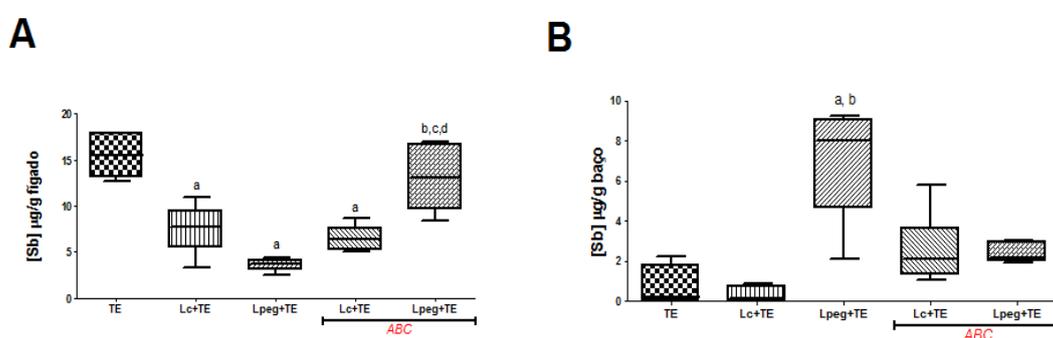
Inesperadamente, foi observado um direcionamento significativo do antimônio para o fígado (2 semanas após tratamento) quando este foi administrado na forma livre em relação aos tratamentos lipossomais sem indução do fenômeno ABC. Collins, Carter e Baillie (1992) também observaram alta concentração de Sb no fígado e significativa supressão da carga parasitária em relação ao baço e à medula óssea pela administração de estibogluconato de sódio (SbV) por via endovenosa em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*. Molokhia e Smith (1969) dosaram os níveis de SbIII nos tecidos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, em intervalos de tempo diferentes (0,5h, 8h, 24h, 2, 4, 7 e 15 dias) após uma única dose intraperitoneal (i.p) de TE. Esses autores observaram que os maiores níveis de Sb se encontravam principalmente no fígado, seguido pelo baço e por órgãos do trato digestivo, 30 minutos após o tratamento.

No grupo em que os animais foram tratados com lipossomas peguילים contendo TE após indução do fenômeno ABC houve um maior direcionamento do Sb para o fígado evidenciando que o fenômeno ABC favoreceu o acúmulo do fármaco para o fígado. Esses achados são consoantes com os observados por Lila; Kiwada; Ishida, (2013) que sugerem que uma segunda dose de lipossomas peguילים é rapidamente eliminada da circulação quando administrada de 2-7 dias após a primeira dose devida à captura dos lipossomas pelos macrófagos do fígado.

Por outro lado, no baço não foi observado o direcionamento do Sb quando os animais foram tratados com lipossomas peguilados com TE após a estimulação do fenômeno *ABC*. Nesse órgão, observou-se maior direcionamento do Sb quando os animais foram tratados com os lipossomas peguilados contendo TE sem indução do fenômeno, em relação à administração do TE livre e de lipossomas convencionais contendo TE. O que sugere um direcionamento sítio-específico do TE para o fígado em detrimento do baço ao se tratar os camundongos com TE em formulações lipossomais peguiladas mediante indução do fenômeno *ABC*.

A concentração de Sb acumulada no fígado e no baço dos animais não infectados e tratados com as diferentes formulações mediante ou não ao fenômeno *ABC* está representada na figura 13.

Figura 13: Concentração de antimônio no fígado e no baço de camundongos BALB/c não infectados após tratamento com tártaro emético livre e em formulações lipossomais. O Sb foi determinado por absorção atômica após digestão das amostras com ácido nítrico. No gráfico **A** e no gráfico **B** foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's e os resultados representados como mediana \pm valor máximo e valor mínimo. Grupos sem indução do fenômeno ABC (animais tratados com PBS - 1ª dose), 2ª dose de: tártaro emético livre (TE); lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do Fenômeno ABC (animais tratados com Lpeg - 1ª dose) 2ª dose de: lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE) e lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). (n=4). As letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a: (a) TE, (b) Lc+TE, (c) Lpeg+TE, (d) Lc+TE mediante fenômeno ABC.



A dose de lipídios utilizada e o tamanho das vesículas lipossomais interferem diretamente na captura dos lipossomas pelos macrófagos (AZEVEDO *et al.*, 2014). Lipossomas pequenos, com diâmetro inferior a 100 nm, são capturados com menor eficiência, apresentando assim uma permanência mais prolongada na circulação sanguínea liberando o fármaco de forma mais sustentada (FRÉZARD *et al.*, 2005). Por outro lado, Schettini *et al.*, (2006) observaram que formulações lipossomais convencionais contendo antimoniato de meglumina administrados via endovenosa, com diâmetro médio de aproximadamente 400 nm, promoveram o aumento da concentração de Sb no fígado e baço de cães em relação a administração do fármaco em sua forma livre, ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho. Esses dados podem ser explicados pelo maior tamanho dos lipossomas, pelo modelo experimental utilizado e pelo tempo de dosagem do Sb após administração do fármaco (96h).

Azevedo *et al.*, (2014) mostraram que não houve diferença significativa na concentração de Sb no fígado e no baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum* quando se comparou formulações convencionais e peguiladas

contendo antimônio pentavalente. Porém observaram um maior direcionamento do Sb para a medula óssea dos animais no tratamento realizado com lipossomas peguados. Essa dosagem não pôde ser realizada em nosso trabalho, tendo em vista, o reduzido tamanho da medula óssea do nosso modelo experimental.

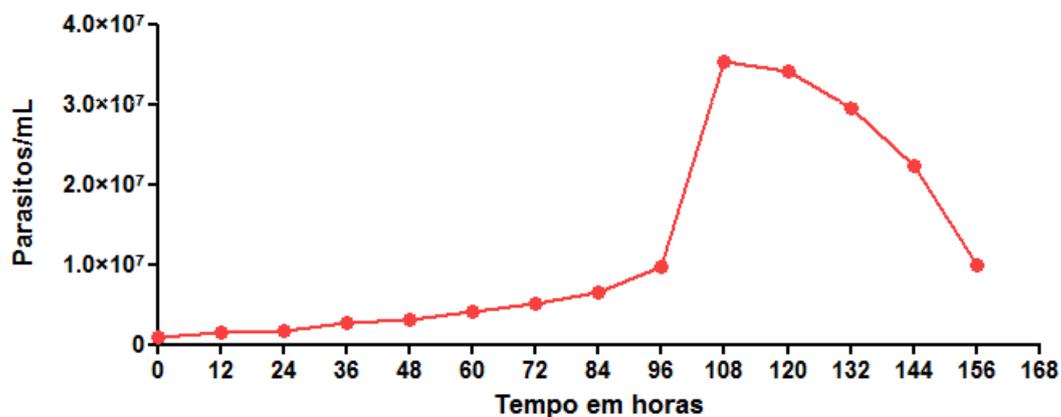
ETAPA 3

Esta etapa foi realizada com o objetivo de avaliar a eficácia dos diferentes tratamentos propostos em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e de se avaliar as lesões encontradas nos principais órgãos acometidos pela doença, fígado e baço.

5.6 – Curva de crescimento da cepa C46

Para a utilização da cepa C46 de *L. infantum* no desenvolvimento deste trabalho, realizou-se uma curva de crescimento do parasito. Esta cepa, após seu isolamento e caracterização, foi mantida em meio LIT (*liver infusion tryptone*) no Laboratório de Imunopatologia (LIMP) - NUPEB – UFOP. Como seu cultivo passou a ser realizado em meio Grace 10% de SFB, estabeleceu-se uma nova curva de crescimento. A figura 14 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 quinto dia para os parasitos da cepa C46 quando a cultura foi iniciada na concentração de 1×10^5 parasitos/mL em meio Grace 10% de SFB.

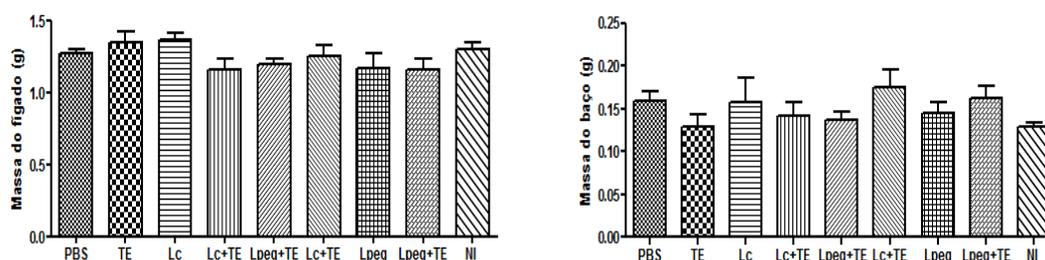
Figura 14: Curva de crescimento *in vitro* dos parasitos da cepa C46 de *Leishmania infantum* em meio Grace 10% de soro fetal bovino.



5.7 – Avaliação da massa do fígado e do baço dos camundongos infectados por *Leishmania infantum* e tratados

Um dos principais sinais clínicos que ocorrem durante o curso da leishmaniose visceral humana é a hepatoesplenomegalia. Nesse sentido, para avaliar possíveis alterações decorrentes da infecção ou do tratamento, foi analisada a massa do fígado e do baço dos animais deste estudo. Porém, não foram observadas diferenças entre os grupos infectados e submetidos a diferentes tratamentos e nem destes grupos em relação aos animais não infectados (NI), como observado na Figura 15.

Figura 15. Massa do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. Grupos sem indução do fenômeno ABC: Grupo controle (PBS); Animais tratados com tártaro emético livre (TE); Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc); Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do Fenômeno ABC: Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados vazios (Lpeg) e Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). NI = camundongos não infectados com *Leishmania infantum*. One Way ANOVA. Os resultados estão representados como média \pm dp. (n= 6).



Marcon (2011) também não observou modificações na massa do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e não tratados, eutanasiados cinco semanas após a infecção, indicando que a infecção não provocou o aumento destes órgãos. Porém, contrastando com nossos resultados encontrou um aumento significativo na massa do baço dos animais ao utilizar lipossomas vazios, constituídos de DSPC, CHOL e dicetilfosfato (DCP) (5:4:1) ou com antimônio pentavalente encapsulado em lipossomas. Neste caso é importante ressaltar que a composição dos lipossomas e o fármaco utilizados são diferentes daqueles utilizados neste trabalho. Serafim *et al.*, (2010) também não observaram alterações da massa do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, eutanasiados quatro semanas após a infecção.

5.8 - Quantificação de parasitos no fígado, baço e medula óssea.

A Figura 16 mostra a carga parasitária no fígado, baço e medula óssea dos animais após tratamento com as diferentes formulações, com indução ou não do fenômeno *ABC*, conforme esquema metodológico apresentado na Figura 7.

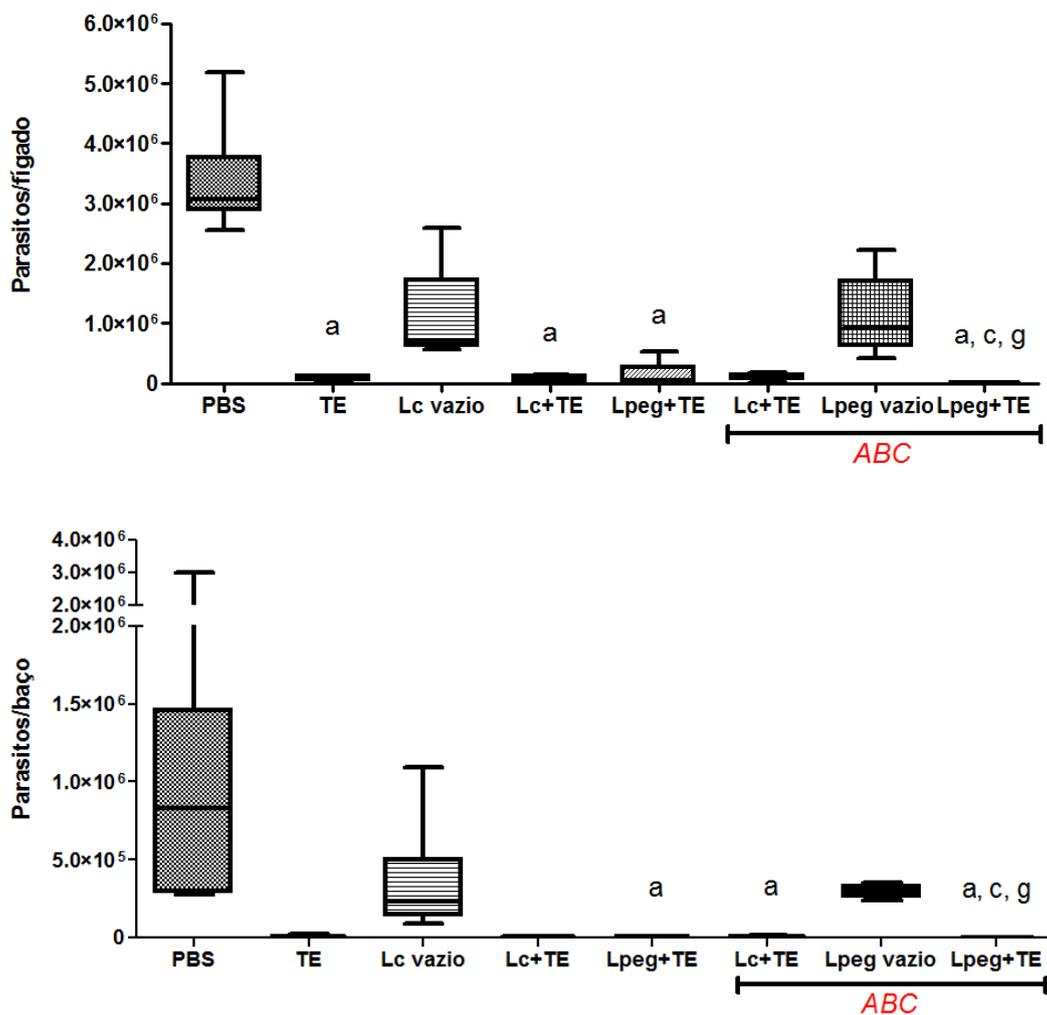
A análise da carga parasitária no fígado demonstrou que os tratamentos realizados com TE livre, lipossomas convencionais contendo TE, lipossomas peguilados + TE, ambos sem a indução do fenômeno *ABC* ou com lipossomas peguilados contendo TE com indução do fenômeno *ABC* reduziram significativamente a carga parasitária em relação ao grupo controle – PBS e lipossomas vazios. No entanto, não se observou diferença significativa entre o grupo tratado com lipossomas peguilados contendo TE com relação ao grupo sem indução do fenômeno *ABC*.

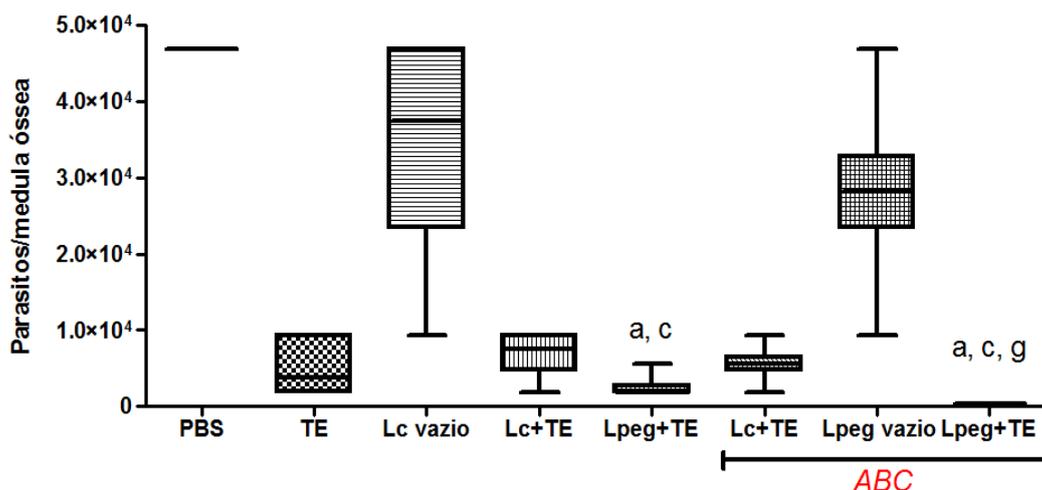
A análise da carga parasitária no baço demonstrou que a formulação lipossomal peguilada contendo TE sem indução do fenômeno *ABC* e as convencionais e peguiladas contendo TE com indução do fenômeno *ABC* reduziram a carga parasitária em relação ao grupo controle (PBS). O tratamento com TE livre não teve efeito sobre a carga parasitária.

Na medula óssea, observou-se uma significativa supressão da carga somente nos animais tratados com lipossomas peguilados contendo TE. No entanto, o fenômeno *ABC* não provocou alteração.

Em todos os três órgãos analisados, o tratamento realizado com lipossomas peguilados contendo TE com indução do fenômeno *ABC* foi eficaz em reduzir a carga parasitária.

Figura 16. Carga parasitária no fígado, baço e medula óssea de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. Grupos sem indução do fenômeno ABC: Grupo controle (PBS); Animais tratados com tártaro emético livre (TE); Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc); Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do Fenômeno ABC: Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados vazios (Lpeg) e Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. Os resultados estão representados como mediana \pm valor máximo e valor mínimo. As letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a: (a) PBS, (c) Lc vazio, e (g) Lpeg vazio. ($n = 6$).





Nossos resultados corroboram os encontrados por Castro *et al.*, (2014) que observaram eficácia de formulações lipossomais convencionais contendo TE (9 mg/kg) em reduzir a carga parasitária no fígado e no baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*.

O tratamento com TE livre, por via endovenosa, na mesma concentração utilizada para o tratamento com as formulações lipossomais (12 mg/Kg) foi capaz de reduzir a carga parasitária no fígado mas não no baço ou medula óssea dos animais. No entanto, essa supressão não foi observada em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, (CASTRO *et al.*, 2014), no qual os animais foram tratados com dose única de 9 mg/kg de animal por via intraperitoneal. Este resultado está intimamente relacionado com as altas concentrações de Sb no fígado dos animais tratados com TE livre observadas neste trabalho.

As formulações de lipossomas vazios, Lc vazio e Lpeg vazio, não tiveram efeito sobre a carga parasitária no fígado, baço ou medula óssea, assim como observado por Castro *et al.*, (2014). Ribeiro *et al.*, (2008) também não observaram alteração da carga parasitária no fígado e no baço de cães infectados por *L. infantum* tratados com lipossomas vazios.

O tamanho dos lipossomas preparados e utilizados neste trabalho (± 200 nm) atende à necessidade de vetorização não apenas para fígado e baço, mas também para a medula óssea como um importante avanço para eliminação do parasito no fígado, baço e medula óssea.

Azevedo *et al.*, (2014) relataram a eficácia de formulações lipossomais peguiladas contendo antimônio pentavalente com redução significativa do

número de parasitos no fígado, baço e medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, assim como observaram que lipossomas convencionais não reduziram a carga parasitária na medula óssea dos animais, o que corrobora os resultados obtidos neste trabalho. Estudos de De Melo *et al.*, (2003) mostraram que a encapsulação do TE em lipossomas de longa circulação além de reduzir significativamente a toxicidade do fármaco foi capaz de aumentar a eficácia do antimonial trivalente em modelo experimental de esquistossomose mansoni, provocando redução no número de vermes (82%) em comparação ao grupo controle.

5.9 – Análises histopatológicas do fígado e do baço de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos aos diversos tratamentos

Com o objetivo de avaliar o impacto da administração dos diversos tratamentos propostos nos tecidos hepáticos e esplênicos de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*, fragmentos destes órgãos de todos os animais em experimentação foram coletados, processados, corados por H&E e analisados.

Carrión *et al.*, (2006) avaliaram as alterações histopatológicas no fígado de camundongos infectados com número diferente de parasitos e estas foram visualizadas apenas nos animais inoculados com 10^5 e 10^6 parasitos (*L. donovani*) sendo, portanto, dependentes da concentração do inoculo.

Camundongos BALB/c infectados por *L. donovani* apresentam uma susceptibilidade inicial à infecção, entretanto, nos estágios tardios pós-infecção ocorre um controle na carga parasitária, sendo esta mantida em baixos níveis durante a infecção crônica. Nesse modelo experimental, o controle da infecção, está associado à resposta imune mediada por células envolvendo linfócito T TCD4⁺ e TCD8⁺, 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).

As principais alterações encontradas em cada grupo estudado estão expressas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Alterações histológicas no fígado de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos aos diferentes tratamentos: Grupos sem indução do fenômeno ABC: Grupo controle (PBS); Animais tratados com tártaro emético livre (TE); Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc); Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do Fenômeno ABC: Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados vazios (Lpeg) e Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). (n = 4).

	PBS	TE	Lc	Lc+TE	Lpeg+TE	Lc+TE	Lpeg	Lpeg+TE
	(%)							
<i>Inflamação do parênquima hepático</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Inflamação portal</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Processos degenerativos</i>	50%	100%	100%	0%	50%	100%	100%	50%
<i>Hiperemia</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Hemossiderose</i>	50%	50%	50%	0%	0%	0%	50%	0%
<i>Granuloma</i>	50%	100%	100%	50%	0%	0%	50%	0%

Tabela 4. Alterações histológicas no baço de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos aos tratamentos: Grupos sem indução do fenômeno ABC: Grupo controle (PBS); Animais tratados com tártaro emético livre (TE); Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc); Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do Fenômeno ABC: Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); Tratados com lipossomas peguilados vazios (Lpeg) e Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). (n = 4).

	PBS	TE	Lc	Lc+TE	Lpeg+TE	Lc+TE	Lpeg	Lpeg+TE
	(%)							
<i>Reatividade esplênica</i>	100%	100%	100%	50%	25%	25%	100%	0%
<i>Espessamento de cápsula ou trabécula</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Esplenite capsular</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Hiperplasia de polpa branca</i>	100%	100%	100%	50%	25%	25%	100%	0%
<i>Hemossiderose</i>	100%	100%	100%	50%	50%	50%	75%	50%
<i>Hiperemia</i>	25%	50%	25%	0%	0%	0%	25%	0%
<i>Anergia</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Os animais infectados por *L. infantum* e tratados com o TE veiculado em lipossoma não apresentaram pigmentos de hemossiderina no fígado e reduziram os granulomas. Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram redução da inflamação e do número de granulomas em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e tratados com lipossomas convencionais encapsulando SbV (antimoniato de meglumina) (MARCON, 2011).

Após a infecção experimental de camundongos pela veia da cauda com promastigotas de *L. infantum*, os parasitos entram no baço através da artéria esplênica e rapidamente são removidos da circulação por macrófagos e células dendríticas da zona marginal. Neste momento mais de 95% dos parasitos são fagocitados pelos macrófagos e após 24h aproximadamente 50% dos mesmos estarão mortos. As células dendríticas capturam antígenos dos parasitos e migram para a bainha linfóide periarteriolar onde os apresentam para células T e NK e passam a secretar IL-12, entretanto a resposta imune é falha e estabelece-se uma infecção crônica no baço. A persistência dos parasitos é acompanhada pela impossibilidade de formação de granulomas, esplenomegalia, destruição da microarquitetura esplênica e aumento da

atividade hematopoiética (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Ao analisarmos o baço observamos que o grupo tratado com Lpeg + TE mediante indução do fenômeno ABC foi o único a não apresentar reatividade esplênica e hiperplasia de polpa branca. Alterações na celularidade da polpa branca podem ser desencadeadas por uma resposta aguda a antígenos aumentando a quantidade de células B (CESTA, 2006).

As principais lesões encontradas no fígado e no baço de camundongos não infectados e tratados e camundongos infectados por *L. infantum* e submetidos aos diversos tratamentos estão apresentados na Figura 17 e 18, respectivamente.

Figura 17. Fotomicrografias representativas das principais lesões observadas em cortes de fígado de animais não infectados e tratados (**a – h**) e animais infectados por *Leishmania infantum* e tratados (**i – p**), corados com hematoxilina e eosina. Grupos sem indução do fenômeno ABC: **a** - Grupo controle (PBS); **b** - Animais tratados com tártaro emético livre (TE); **c** - Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc vazio); **d** - Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); **e** - Tratados com lipossomas peguillados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do fenômeno ABC: **f** – Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); **g** - Tratados com lipossomas peguillados vazios (Lpeg vazio) e **h** - Tratados com lipossomas peguillados + tártaro emético (Lpeg+TE). Grupos sem indução do fenômeno ABC: **i** - PBS; **j** - TE; **k** - Lc vazio; **l** - Lc+TE; **m** - Lpeg+TE; Grupos com indução do fenômeno ABC: **n** - Lc+TE; **o** - Lpeg vazio e **p** - Lpeg+TE. Seta preta – granuloma. Seta branca – hiperemia. Asterisco – degeneração. Cabeça de seta preta – pigmentos de hemossiderina. Aumento 440x.

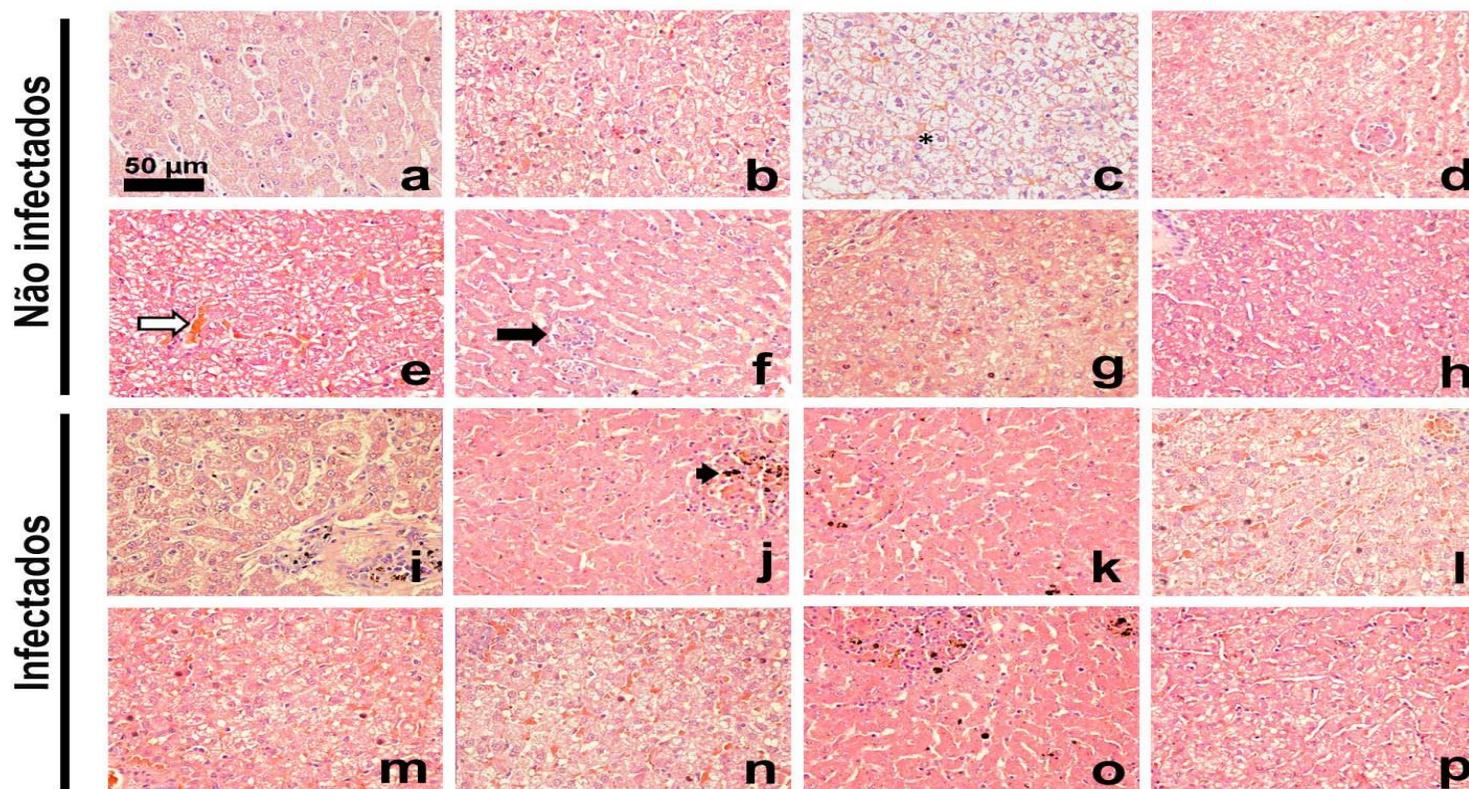
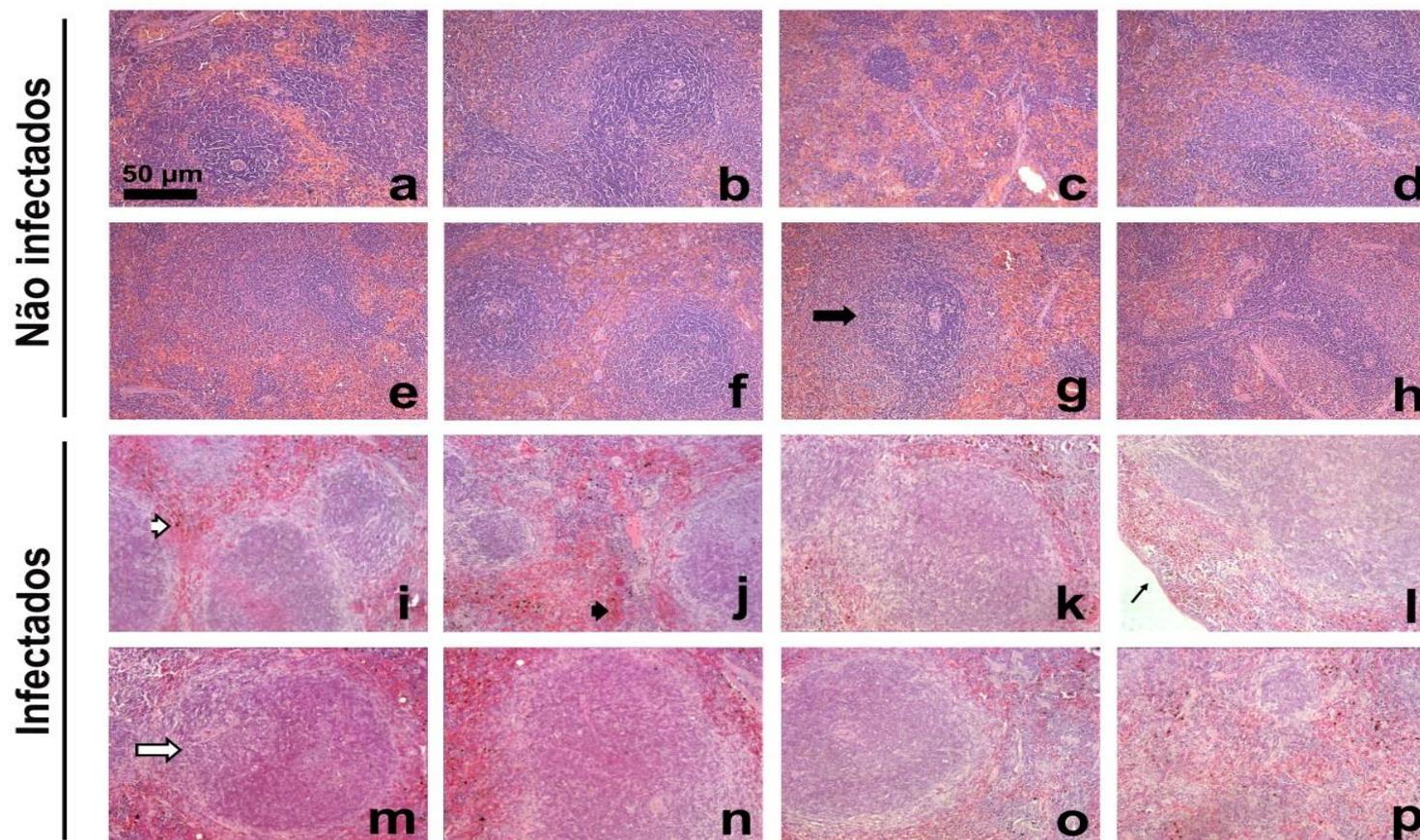


Figura 18: Fotomicrografias representativas das principais lesões observadas em cortes de baço de animais não infectados e tratados (a – h) e animais infectados por *Leishmania infantum* e tratados (i – p), corados com hematoxilina e eosina. Grupos sem indução do fenômenos ABC: a - Grupo controle (PBS); b - Animais tratados com tártaro emético livre (TE); c - Tratados com lipossomas convencionais vazios (Lc vazio); d - Tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); e - Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE); Grupos com indução do fenômeno ABC: f – Animais tratados com lipossomas convencionais + tártaro emético (Lc+TE); g - Tratados com lipossomas peguilados vazios (Lpeg vazio) e h - Tratados com lipossomas peguilados + tártaro emético (Lpeg+TE). Grupos sem indução do fenômeno ABC: i - PBS; j - TE; k - Lc vazio; l - Lc+TE; m - Lpeg+TE; Grupos com indução do fenômeno ABC: n - Lc+TE; o - Lpeg vazio e p - Lpeg+TE. Seta branca – hiperplasia e hipertrofia de nódulo linfóide, seta preta – nódulo linfóide, seta preta fina – cápsula, cabeça de seta branca – pigmento de hemossiderina, cabeça de seta preta – hiperemia. Aumento de 220x.



6 – CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho mostraram que a formulação de lipossomas peguilados contendo tártaro emético são promissoras para o tratamento da leishmaniose visceral experimental, visto que controlam o parasitismo nos três principais órgãos acometidos pela doença e diminuem as lesões relacionadas a toxicidade renal atribuída ao TE em sua forma livre. Por outro lado, os resultados também demonstraram que a ativação do fenômeno *ABC* não interferiu na eficácia das formulações peguiladas de tártaro emético.

7 – REFERÊNCIAS

ABU LILA, A. S., KIWADA, H., ISHIDA, T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. **J. Control. Rel.** v. 172, p. 38–47, 2013.

ALBERGANTE, L., TIMMIS, J., BEATTIE, L., KAYE, P. M. A Petri Net Model of Granulomatous Inflammation: Implications for IL-10 Mediated Control of *Leishmania donovani* Infection. **Plos Comput Biol.** v.9, p.1-13, 2013.

ALENCAR, J. E., DIETZE, R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 8ª ed: 706-17, 1991.

ALLEN, T. M., HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: Effect of Dose. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1068, p. 133-141, 1991.

ALVAR J., VÉLEZ I. D., BERN C., HERRERO M., DESJEUX P., CANO J., JANNIN J., DEN BOER M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. v. 7, p. 356-71, 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, p.2959-63, 1978.

ANDERSON, M., OMRI, A. The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. **Drug Delivery**. v.1, p. 33-39, 2004

ANDRADE, Z. A., ANDRADE, S. G. Some new aspects of the kalaazar pathology.(Morphologic study of 13 autopsy cases). **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 8, p. 259-266, 1966.

AZEVEDO, E. G., RIBEIRO, R. R., SILVA, S. M., FERREIRA, C. S., SOUZA, L. E., FERREIRA, A. A. F, CASTRO, R. A. O., DEMICHELI, C., REZENDE, S. A., FRÉZARD, F. Mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opin Drug Deliv.**, v. 11, p. 1-10. 2014.

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

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

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, p. 167-179, 2007.

BLACK, C. D. V, WATSON, G. J, WARD, R. J. The use of pentostam liposomes in the chemotherapy in experimental leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 71, p. 550-552, 1977

BORBOREMA, S. E. T. **Desenvolvimento e farmacocinética de antimônio encapsulado em lipossomas de fosfatidilserina utilizando radioisótopos em leishmaniose experimental.** 2010. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) - Instituto de

Pesquisas Energéticas e Nucleares - Autarquia Associada À Universidade de São Paulo, São Paulo - SP.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas / Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p. 60, 2003

BRASIL. SVS/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

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

CASTRO, R. A. O., SILVA-BARCELLOS, N. M., LICIO, C. S. A., Souza J. B., SOUZA-TESTASICCA, M. C., FERREIRA, F. M., BATISTA, M. A., SILVEIRA-LEMOS, D., MOURA, S. L., FRÉZARD, F., REZENDE, S. A. Association of liposome-encapsulated trivalent antimonial with ascorbic acid: an effective and safe strategy in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **Plos One**. v. 9, p. 1-9, 2014.

CESTA, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicol Pathol.**, v. 34, 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, p. 873-82, 2007.

COLLINS, M., CARTER, K. C., BAILLIE, A. J. Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse: antimony tissue disposition and parasite suppression after the administration of free stibogluconate. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.86, p.35-40, 1992.

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

DA SILVA, S. M., AMORIM, I. F., RIBEIRO, R. R., AZEVEDO, E. G., DEMICHELI, C., MELO, M. N., TAFURI, W L., GONTIJO, N. F., MICHALICK, M. S., FRÉZARD, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chem.**, v. 56, p. 2858–2867, 2012.

DAMS, E. T., LAVERMAN, P., OYEN, W. J., STORM, G., SCHERPHOF, G. L., VAN DER MEER, J. W., CORSTENS, F. H., BOERMAN, O. C. Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.292, p. 1071–1079, 2000.

DAVIES, C. R, KAYE, P., CROFT, S. L, SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ**, v. 326, p. 377– 82, 2003.

DEANE, L. M, DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital**. v.48, p. 61-76, 1955.

DE MELO, A. L., SILVA-BARCELLOS, N. M., DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **Intern. J. of Pharm.**, v. 255, p. 227-230, 2003.

DI CRISTINA, G., CARONIA, G. Sulla terapia della leishmaniosi interna. **Bulletin de la Société de Pathologie Éxotique**, v. 8, p. 63-65, 1915.

DIETER, M. NTP technical report on the toxicity studies of Toxicity Studies of antimony potassium tartrate (CAS No. 28300-74-5) in F344/N Rats and B6C3F1 mice (Drinking Water and Intraperitoneal Injection Studies). **Nat. Tox. Program. Toxic Report.**, 1992.

DOBROVOLSKAIA, M. A., GERMOLEC, D. R., WEAVER, J. L. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. **Nat. Nanotec.**, v.4, p. 411- 414, 2009.

DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo. **Patologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 1406-1415.

ENGWERDA, C. R., ATO, M., COTTERELL, S. E. J., MYNOTT, T. L., TSCHANNERL, A., GORAK-STOLINSKA, P. M. A., KAYE, P. M. a role for tumor necrosis factor- in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **Am J Pathol.** v.161, p.429–437, 2002.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 161–171, 2005.

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

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, N^o. 3, p. 511-518, 2005.

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opin. Drug Deliv**, v. 7 (12), p. 1343-58, 2010.

GUERIN, P. J., OLLIARO, P., SUNDAR, S., BOELAERT, M., CROFT, S. L., DESJEUX, P., WASUNNA, M. K., BRYCESON, A. D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect. Dis.**, v.2, p. 494-501, 2002.

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.

HARASYM, T.O.; TARDI, P., LONGMAN, S. A., ANSELL, S. M., BALLY, M. B., CULLIS, P. R., CHOI, L. S. Poly(ethylene glycol)-modified phospholipids prevent aggregation during covalent conjugation of proteins to liposomes. **Bioconjugate Chem.**, v. 6, p. 187-194, 1995.

HEATH, S., CHANCE, M. L., NEW, R. R. C. Quantitative and ultrastructural studies on the uptake of drug loaded liposomes by mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 12, p.49-60, 1984.

HEPBURN, N. C., SIDDIQUE, I., HOWIE, A. F., BECKETT, G. J., HAYES, P. C. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate in leishmaniasis. . **Trans. R. Soc. Trop. Med.**,v. 88, p.453-455, 1994.

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

HOARE, C. A. Early discoveries regarding the parasite of oriental sore **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 32,p. 67-86, 1938.

HOMMEL, M., JAFFE, C.L., TRAVI, B., MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann Trop Med Parasitol.** v. 89, p. 55-73, 1995.

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.

HUYNH, C., ANDREWS, N. W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of Leishmania. **Cell Microbiol**, v. 10, p. 293-300, 2008.

IMMORDINO, M. L., DOSIO, F., CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **Int J Nanomedicine**, v. 1, p. 297-315, 2006.

ISHIDA, T.; ATOBE, K.; WANG, X.; KIWADA, H. Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes upon repeated injections: effect of doxorubicin encapsulation and high-dose first injection. **J. Control Release**, v.115, p. 251–258, 2006.

KATO, K. C., TEIXEIRA, E. M., REIS, P.G., SILVA-BARCELLOS, N. M. SALAÜN, P., CAMPOS, P. P., CORRÊA, J. D. J., RABELLO, A.,

DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58(1), p. 481-88, 2014.

KAYE, P. M., SVENSSON, M., ATO, M., MAROOF, A., POLLEY, R., STAGER, S., ZUBAIRI, S., ENGWERDA, C. R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 239-253, 2004.

LASIC, D. D. Doxorubicin in Sterically Stabilized Liposomes. **Nature**, v. 380, p. 561-562, 1996.

LAVERMAN, P., BOERMAN, O. C., OYEN, W. J. G, DAMS, E. TH. M., STORM, G., CORSTENS, F. H. M. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. **Adv. Drug Deliver. Rev.** v. 37, p. 225–235, 1999.

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, p.1327-34, 2007.

LÍCIO, C. S. A. **Avaliação da Toxicidade Aguda do Antimônio Trivalente: formas livre ou liposomal associada ou não à administração de ácido ascórbico.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto – MG.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.** v. 51, p. 247-253, 2009.

LÖFGREN, S. E., MILETTI, L. C., STEINDEL, M., BACHÈRE, E., BARRACCO, M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Exp Parasitol.**, v.118, p. 197–202, 2008.

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, p. 234-8, 2010.

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.

MAYER, L. D., HOPE, M. J. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, p. 193-197, 1985.

MELBY, P.C., CHANDRASEKAR, B., ZHAO, W., COE, J.E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and

impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J Immunol.** v. 166, p. 1912-1920, 2001.

MEYERHOFF, A. U. S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 42-48, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim eletrônico Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. (SMS/MS). Ano 10, n° 2; 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.

MOLOKHIA, M. M., SMITH, H. tissue distribution of trivalent antimony in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Bull World Health Organ.** v.40, p.123–128, 1969.

MOUGNEAU, E. BIHL, F. GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol Rev.** v. 240, p. 286-296, 2011.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, p. 249-267, 2001.

NAYAR, R., HOPE, M. J., CULLIS, P. R. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 986, p. 200-206, 1989.

NIETO, A., DOMÍNGUES-BERNAL, G., ORDER, J. A., DE LA FUENTE, R., MADRID-ELENA, N., CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Vet Res**, v. 42:39, p. 1-13, 2011.

OLIVEIRA, A. L., BRUSTOLONI, Y. M., FERNANDES, T.D, DORVAL, M. E, CUNHA, R. V., BÓIA, M. N. Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. **Trop. Doct.** v. 39, p. 180–182, 2009.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. Acessado em 16/12/2015.

PATEL, H. M. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. **Crit Ver Ther Drug Carrier Syst.**, v.9, p,39-90, 1992.

PEARSON, R. D., SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v. 22, p.1-13, 1996.

PEREIRA, B. A., ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Vet Parasitol.**, v. 158 (4), p. 239-55, 2008.

RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESÚS, M. N., MARZAL, P. C., JUNIOR, H. F. A., TEMPONE, A. G. Antimoniais 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.

REQUENA, J.M., SOTO, M., DORIA, M.D., ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 76, p. 269-281, 2000.

RIBEIRO, R. R., MOURA, E. P., SAMPAIO, W. M., SILVA, S. M., FULGÊNCIO, G. O., TAFURI, W. L., MICHALICK, M. S. M., FRÉZARD, F. Complement activation-related pseudoallergy in dogs following intravenous administration of a liposomal formulation of meglumine antimone. **Pesq. Vet. Bras**, v.33 (8), 2013.

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., FREZARD, F., MICHALICK, M. S. M. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 52, p. 2564-2572, 2008.

RODRIGUES, R. F, CHARRET, K. S, DA SILVA, E. F, ECHEVARRIA, A. AMARAL, V. F, LEON, L. L, CANTO-CAVALHEIRO, M. M. Antileishmanial activity of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide in mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 53, p. 839-842, 2009.

ROUSSEAU, D., DEMARTINO. S., ANJUÈRE, F., FERRUA, B., FRAGAKI, K., LE FICHOUX, Y., KUBAR, J. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. **Eur Cytokine Netw.**, v. 12 (2), p. 340-7, 2001.

SAGRISTÁ, M. L., MORA, M., MADARIAGA, M. A. Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 5, p. 19-33, 2000.

SANTOS, D. O., COUTINHO, C. E. R., MADEIRA, M. F., BOTTINO, C.G., VIEIRA, R.T., NASCIMENTO, S. B., BERNARDINO, A., BOURGUIGNON, S. C., CORTE-REAL, S., PINHO, R.T., RODRIGUES, C. R., CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment a challenge that remains: a review, **Parasitol. Res.**, v. 103, p. 1–10, 2008.

SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Quím. Nova**, v. 25, p.1181-1185, 2002.

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, p. 140-7, 2006.

SEITZ, H. M. Parasitic diseases of the liver. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol*, v. 79, p. 241-248, 1995.

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, p. 811-817, 2010.

SERENO, D., LEMESRE, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.41. p. 972-976,1997.

SMELT, S. C., ENGWERDA, C. R., MCCROSSEN, M., KAYE, P. M. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **J Immunol**, v. 158, n. 8, p. 3813-3821, 1997.

SOUZA, C. C., BARRETO, T. O., SILVA, S. M., PINTO, A. W. J., FIGUEIREDO, M. M., ROCHA, O. G. F., CANGUSSU, S. D., TAFURI, W. L. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Path.**, v. 95, p. 260–270, 2014.

SRIVASTAVA, P. DAYAMA, A. MEHROTRA, S. SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 105 p. 1–6, 2011.

STANLEY, A. C., ENGWERDA, C. R., Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immun and Cell Biol**, v. 85, p. 138-147, 2007

STEMMER, K. L. Pharmacology and toxicology of heavy metals: antimony. **Pharmac. Ther. A.** v. 1, p.157-160, 1976.

SUNDAR S., SINGH R. K., MAURYA R., KUMAR B., CHHABRA A., SINGH V., *et al.* Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 100, p. 533–7, 2006.

TEMPONE, A. G., PEREZ, D., RATH, S., VILARINHO, A. L., MORTARA, R. A., ANDRADE JR, H. F. D. E. Targeting Leishmania (L.) chagasi amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **J. A. C.**, v.26, p.1-9, 2004.

THANABHORN, S., JAIJOY, K., THAMAREE, S., INGKANINAN, K., PANTHONG, A. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract

from *Locinera japonica* Thunb. **J Ethnopharmacol.**, v. 107, p. 370-373, 2006.

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.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Rev. Drug Disc.**, v. 4, p. 145-160, 2005.

VALADARES, D. G., DUARTE, M. C., OLIVEIRA, J. S., CHÁVEZ-FUMAGALLI. M. A., MARTINS. V. T., LEITE, J. P. V., SANTORO, M. M.; RÉGIS, W. C. B., COSTA, L. E. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitol Int.**, v. 60, p. 357–363, 2011.

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, p.17-23, 2010.

WISE, E. S, ARMSTRONG, M. S, WATSON, J., LOCKWOOD, D. N.. Monitoring toxicity associated with parenteral sodium stibogluconate in the day-case management of returned travelers with New World cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, p. 1688, 2012.

ANEXO I

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

CIPHARMA- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Projeto de Pesquisa: Avaliação do efeito do fenômeno de depuração
sanguínea acelerada de formulação lipossomal peguilada contendo
tártaro emético em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania*
infantum

Aluna: Tamara Cristina Moreira Lopes

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

Co-orientadora: Prof. Dr. José Mário Barichello

Questionário de entrevista

1. Nome: _____

Código: _____

2. Idade: _____

3. Sexo: _____

4. Possui algum problema de saúde, como?

a. Problemas de coagulação sanguínea ()

b. Já apresentou hemorragias ()

c. Já apresentou tromboembolismo/trombose ()

d. Problemas hepáticos/ fígado ()

e. Alguma doença relacionada ao sistema imune ()

f. Outros ()

Qual(is)?: _____

5. Faz uso de algum medicamento? () sim () não

Qual(is)?: _____

6. Faz ou fez ingestão recente de bebida alcoólica? () sim () não

Desde quando? _____