

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

EFICÁCIA *IN VIVO* DE FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS DE CIRCULAÇÃO
PROLONGADA CONTENDO MILTEFOSINA NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA PARA O TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL

Karen Ferraz Faria

Uberlândia-MG
Fevereiro, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

Dissertação apresentada ao
Colegiado do Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Aluna: Karen Ferraz Faria

Orientador: Prof^o. Dr^o Sydnei
Magno da Silva (ICBIM/UFU)

Co-Orientador: Prof^o. Dr^o Frédéric
Jean Georges Frézard (ICB/UFMG)

Uberlândia-MG
Fevereiro, 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F224e
2016

Faria, Karen Ferraz, 1991

Eficácia *in vivo* de formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina na presença ou ausência de antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral / Karen Ferraz Faria. - 2016.

81 p. : il.

Orientador: Sydnei Magno da Silva.

Coorientador: Frédéric Jean Georges Frézard.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Leishmaniose visceral - Teses. 3. Lipossomos - Teses. I. Silva, Sydnei Magno da. II. Frézard, Frédéric Jean Georges. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e ao meu marido, pelo apoio, força, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Sandra e Donizetti, que sempre me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes.

A minha irmã Hellen e a minha avó Sirley, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu marido, Éder, pelo carinho, paciência, principalmente nos meus maiores momentos de dificuldade.

As colegas Camila e Marcela, que se disponibilizaram em me ensinar diversas técnicas laboratoriais.

As colegas mestrandas, Iasmin e Fernanda, pela ajuda na parte experimental do projeto, e por sempre me apoiarem nos momentos mais difíceis.

Aos colegas de laboratório, Daliane, Kelem, Larissa, Letícia, Natália, Marco, Maria Júlia, e Talita, pelos bons momentos e pelo grande processo de crescimento e aprendizado que obtive com cada um de vocês. Vocês tornaram meus dias mais alegres.

A técnica do laboratório Juliana Miranda, pelos ensinamentos e pela ajuda que foi essencial na realização deste trabalho.

Ao orientador Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pela paciência e dedicação, e principalmente por acreditar em minha capacidade em executar esse trabalho.

A Dr. Renata Cristina de Paula, que me ensinou procedimentos metodológicos essenciais para a execução deste trabalho, e para meu crescimento profissional.

A Professora Dra. Márcia Cristina Cury, pela oportunidade de me juntar a equipe do laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, por ceder espaço e pelo suporte na leitura dos experimentos.

Ao professor Dr. Frédéric Frézar e ao Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados da Universidade Federal de Minas Gerais, pela produção e caracterização dos lipossomas.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia. À CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo suporte financeiro.

Colaboradores do projeto

Este trabalho conta com a colaboração do professor Dr. Frédéric Jean Georges Frézard, da Universidade Federal de Minas Gerais; do professor Dr. Raul Rio Ribeiro, da Universidade Federal de Juiz de Fora; Dra. Renata Cristina de Paula, da Universidade Federal de Uberlândia.

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas pelo protozoário *Leishmania* spp. Dentre as principais manifestações clínicas a leishmaniose visceral (LV) é potencialmente letal se não tratada. O tratamento dos doentes continua sendo a principal medida de controle da doença, apresentando várias limitações, como efeitos colaterais e eficácia reduzida. Em razão disso a Organização Mundial da Saúde estimula a busca por novos fármacos ou formulações que possam minimizar tais limitações. Os objetivos desse estudo foram preparar, caracterizar e avaliar a eficácia, *in vitro* e *in vivo* de formulações lipossomais de ação prolongada contendo miltefosina na presença (HePC-PEG/AM) ou ausência (HePC-PEG) de antimoniato de meglumina (AM) para tratamento da LV. HePC-PEG apresentou CC₅₀, determinado pelo método colorimétrico MTT em macrófagos murinos, igual a 97,73µg/mL e HePC-PEG/AM igual a 105,06µg/mL, ambas taxas maiores que a miltefosina livre (44,29µg/mL), sugerindo menor toxicidade celular da droga em formulação lipossomal. Os valores de CI₅₀, determinados pelo teste colorimétrico de redução da resazurina sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum*, foram semelhantes para HePC-PEG (30,72µg/mL), HePC-PEG/AM (32,65µg/mL) e para miltefosina livre (34,23 µg/mL), sugerindo que não houve redução da atividade leishmanicida da miltefosina nas formulações. Contra amastigotas intracelulares, as formulações peguiladas reduziram significativamente as taxas de infecção dos macrófagos em relação ao controle, e macrófagos tratados com AM e com LAM. Não houve alteração da função renal nos ensaios de toxicidade aguda e eficácia terapêutica. No entanto, as enzimas utilizadas para avaliar a função hepática estavam aumentadas ensaio de eficácia terapêutica nos grupos tratados com HePC-PEG, HePC-PEG/AM e miltefosina livre. O ensaio de biodistribuição indicou maiores concentrações de Sb no sangue de camundongos BALB/c nos animais tratados com HePC-PEG/AM que no grupo HePC-PEG + LAM durante toda cinética de 96h. No fígado, 96h após o tratamento a concentração de Sb foi maior no grupo HePC-PEG + LAM que no HePC-PEG/AM. Estes resultados sugerem a influência da composição lipídica na biodistribuição do Sb. Os animais tratados com as formulações HePC-PEG/AM, HePC-PEG + AM e miltefosina apresentaram redução significativa da carga parasitária no fígado e baço em relação ao grupo controle. A formulação HePC-PEG/AM foi a que apresentou melhores resultados de supressão da carga parasitária dos camundongos, com redução significativa do número de parasitos em relação aos grupos controle e AM no fígado e em relação ao controle, AM, LAM e HePC-PEG no baço. De maneira semelhante, a mistura HePC-PEG + LAM reduziu a carga parasitaria significativamente no fígado em relação ao grupo controle e, no baço em relação aos grupos controle e AM, enquanto a miltefosina livre reduziu a carga parasitaria somente em relação ao grupo controle. Pela primeira vez a prova de conceito de que as formulações inovadoras de HePC-PEG/AM e HePC-PEG + LAM apresentam características de nanosistemas estáveis, monodispersos, biocompatíveis e induzem significativa redução das taxas de infecção de *L. infantum*, *in vitro* e *in vivo*, foi confirmada. Estes resultados reforçam o potencial terapêutico destas formulações e abrem novas perspectivas para o tratamento da LV.

Palavras chaves: Leishmaniose visceral, tratamento, miltefosina, antimoniato de meglumina, lipossomas.

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases caused by protozoa *Leishmania spp.* The main clinical manifestations are cutaneous (LC) and visceral leishmaniasis (LV). LV is able to kill if it is not treated. The treatment in infected patients is still the main step of control of the disease, with several limitations like side effects and reduced effectiveness. For this reason the World Health Organization encourages the search for new drugs or formulations that can minimize these limitations. The aim of this study was to prepare, characterize and estimate the effectiveness, *in vitro* and *in vivo*, of long-acting liposomal formulations that contain miltefosine in the presence or absence of meglumine antimoniate (AM), for treatment of visceral leishmaniasis. HePC-PEG showed CC₅₀, determined by colorimetric MTT assay in murine macrophages, equal to 97,73 µg / mL and HepC-PEG / AM equals 105,06 µg / mL, both higher rates than the free miltefosine (44,29 µg / mL) suggesting less cellular toxicity of the drug in liposomal formulation. The IC₅₀ values determined by colorimetric assay Resazurin reduction of promastigote forms of *Leishmania infantum* are similar to HePC-PEG (30,72 µg / mL), PEG-HEPC / AM (32,65 µg / mL) and free miltefosine (34.23 mg / mL), suggesting that there was no reduction in the leishmanicidal activity of miltefosine in the formulations. Against intracellular amastigotes, the pegylated formulations significantly reduced macrophages infection rates compared to the control and treated macrophages AM and LAM. There was no change in renal function in acute toxicity tests and therapeutic efficacy. However, the enzymes used to evaluate liver function test were increased therapeutic efficacy of the HePC-PEG treated groups, HEPC-PEG/AM free and miltefosine. The biodistribution test indicates higher concentrations of Sb in the blood of BALB/c animals treated with HEPC-PEG/AM in the HEPC-PEG + LAM group throughout kinetics 96h. In the liver 96 hours after the treatment the concentration of Sb is greater in the HEPC-PEG + LAM group in HEPC-PEG/AM. These results suggest the influence of the lipid composition in the Sb biodistribution. Animals treated with the HePC-PEG/AM formulations HePC-PEG + AM and miltefosine showed a significant reduction of the parasite load in the liver and spleen compared to control group. The HePC-PEG/AM formulation was the one with the best results in suppression of the parasitic load of the mice, with significant reduction in the number of parasites in relation to control groups and AM in the liver and in the control, AM, LAM and HePC-PEG spleen. Similarly, the mixture HEPC-PEG + LAM reduced parasitic load significantly in the liver compared to the control group and in the spleen compared to control groups and AM, while the free miltefosine reduced parasitic load only in the control group. First proof of concept that the innovative formulations HePC-PEG / AM and HePC-PEG + LAM nanosystems have characteristics of stable, monodisperse, biocompatible and induce significant reduction of *L. infantum* infection rates *in vitro* and *in vivo*, was confirmed. These results reinforce the therapeutic potential of these formulations and open new perspectives for the treatment of VL.

Key words: visceral leishmaniasis, treatment, miltefosine, meglumine antimoniate, liposomes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização dos lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG), lipossomas peguilados contendo miltefosina e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM), antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais (LAM).....46

Tabela 2: Valores de CC_{50}^a determinados para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, valores de CI_{50}^b determinados para formas promastigotas de *Leishmania infantum* e índice terapêutico (IT)^c após incubação por 72 horas com formulações testadas.....48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência da Leishmaniose visceral no mundo	19
Figura 2: Representação do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp	21
Figura 3: Organograma com o resumo das metodologias utilizadas nesse trabalho	43
Figura 4: Curva de crescimento de <i>Leishmania infantum</i> cepa MHOM/BR/1967/BH46 em meio de cultura quimicamente definido α -MEM	44
Figura 5: Imagem representativa do diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas (<i>Z-average size</i>) e índice de polidispersão da formulação (<i>PDI</i>) de um lote da formulação lipossomal peguilada contendo miltefosina (HePC-PEG) determinado por espectroscopia de correlação de fótons.....	45
Figura 6: Imagem representativa do potencial zeta (<i>Zeta potential</i>) de um lote da formulação lipossomal peguilada contendo miltefosina (HePC-PEG) determinado por espectroscopia de correlação de fótons	46
Figura 7: Perfil cromatográfico das formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina (HePC-PEG) e miltefosina e AM (HePC-PEG/AM) e dos seus constituintes	47
Figura 8: Ensaio de eficácia de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimonio de meglumina (HePC-PEG/AM) contra amastigotas intracelulares de <i>Leishmania infantum</i> (MHOM/BR/1967/BH46) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	50
Figura 9: Ensaio de eficácia de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimonio de meglumina (HePC-PEG/AM) contra amastigotas intracelulares de <i>Leishmania infantum</i> (MHOM/BR//1967/BH46) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	51

Figura 10: Níveis séricos de transaminases pirúvica e oxalacética (TGP e TGO), proteínas totais, albuminas, ureia e creatinina, determinados após administração de dose única de miltefosina e de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimonio de meglumina (HePC-PEG/AM) em camundongos BALB/c.....53

Figura 11: Concentração do antimônio (Sb) determinada no sangue e no fígado de camundongos BALB/c após administração de dose única de formulação lipossomal de circulação prolongada contendo miltefosina e antimonio de meglumina (HePC-PEG/AM) e da mistura composta pela formulação lipossomal de circulação prolongada contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimonio de meglumina encapsulado em formulação lipossoma convencional (LAM).....54

Figura 12: Níveis séricos de transaminases oxalacética (TGO) e pirúvica (TGP), creatinina, e uréia em camundongos BALB/c, dez dias após administração de formulações lipossomais de circulação prolongada HePC-PEG, HePC-PEG/AM, lipossomas convencionais LMA, mistura de HePC-PEG e LMA , antimonio de meglumina e miltefosina.....56

Figura 13: Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) no fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com 10^7 promastigotas de *Leishmania infatum* (MHOM/BR/1967/BH46), dez dias após administração de formulações de circulação prolongada HePC-PEG, HePC-PEG/AM, lipossomas convencionais LMA, mistura de HePC-PEG e LMA , antimonio de meglumina e miltefosina.....57

Figura 14: Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) no baço de camundongos infectados com com 10^7 promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1967/BH46), dez dias após a administração de formulacoes lipossomais de circulação prolongada contendo HePC-PEG/AM, HePC-PEG, lipossomas convencionais LMA e antimonio de meglumina.....58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM: Antimoniato de meglumina

CBEA/UFU: Centro de bioterismo e experimentação animal da Universidade Federal de Uberlândia

CCD: Cromatografia em camada delgada

CC₅₀: Concentração citotóxica em 50%

CEUA: Comitê de Ética na Utilização de Animais

CHOL: Colesterol

CI₅₀: Concentração inibitória em 50%

DCP: Dicetilfosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

DSPE-PEG2000: Diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000

HePC: Miltefosina

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

IP: Índice de polidispersão

LC: Leishmaniose cutânea

LCM: Leishmaniose cutâneomucosa

LT: Leishmaniose tegumentar

LV: Leishmaniose visceral

MLV: Vesícula multilamelar

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio

OMS: Organização Mundial de Saúde

PEG: Polímero de etileno glicol

PBS: Tampão fosfato salino

PSG: “*Promastigote secreted gel*”

qPCR: PCR quantitativa

RPM: Rotações por minutos

SFB: Soro fetal bovino

SMF: Sistema mononuclear fagocitário

SUV: Vesícula unilamelar pequena

TGP: Transaminase glutâmico oxalacética

TGO: Transaminase glutâmico pirúvica

α -MEM: Minimum Essencial Medium Alpha modificatio

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Leishmanioses	17
1.2	Transmissão e Ciclo biológico	19
1.3	Leishmaniose visceral	22
1.4	Leishmaniose visceral no Brasil	23
1.5	Quimioterapia convencional das leishmanioses e suas limitações	24
1.6	Lipossomas como nanocarreadores de fármacos para o tratamento das leishmanioses	27
2	Justificativa	28
3	Objetivos	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	Material e Métodos	30
4.1	Parasitas	30
4.2	Animais	30
4.3	Isolamento e Manutenção de <i>Leishmania infantum</i>	31
4.4	Curvas de crescimento de <i>Leishmania infantum</i> em meio de cultura	32
4.5	Preparo das formulações	32
4.5.1	Antimoniato de meglumina	32
4.5.2	Lipossomas convencionais contendo AM	32
4.5.3	Lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG)	33
4.5.4	Lipossomas peguilados contendo miltefosina e AM (HePC-PEG/AM) ..	34
4.5.5	Detecção de HePC nas formulações peguiladas por cromatografia em camada delgada	34

4.6	Estudo da atividade leishmanicida in vitro	35
4.6.1	Eficácia das formulações sobre a viabilidade das formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	35
4.6.2	Estudo da citotoxicidade.....	36
4.6.3	Ensaio de eficácia contra amastigotas intracelulares de <i>Leishmania infantum</i>	37
4.7	Ensaio de eficácia em modelo murino de LV	37
4.7.1	Biodistribuição e toxicidade das formulações lipossomais	37
4.7.2	Teste de eficácia em modelo murino	40
4.8	Análise estatística.....	42
5	Resultados.....	44
5.1	Curva de crescimento de <i>Leishmania infantum</i>	44
5.2	Caracterização das formulações lipossomais HePC-PEG, HePC-PEG/AM e LAM	45
5.3	Ensaio de eficácia das formulações HePC-PEG, HePC-PEG/AM e LAM em modelo <i>in vitro</i> de leishmaniose visceral	48
5.4	Ensaio de eficácia das formulações HePC-PEG, HePC-PEG/AM e LAM em modelo murino de leishmaniose visceral.....	51
6	Discussão.....	58
7	Conclusões.....	68
8	Referências Bibliográficas.....	69
9	Anexos.....	81
9.1	ANEXO 1.....	81

1 Introdução

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças que podem comprometer pele, mucosa e vísceras, dependendo da espécie de parasito que acomete o hospedeiro e da resposta imune do indivíduo. Essas doenças determinam um grave problema de saúde pública e são causadas por protozoário intracelular obrigatório pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (LAINSON & SHAW, 2005; WHO, 2015).

Os protozoários do gênero *Leishmania*, são pleomórficos e apresentam as formas evolutivas promastigota e paramastigota, móveis e com o flagelo aparente, que se desenvolvem no trato intestinal do inseto hospedeiro. E as formas amastigotas, imóveis e sem flagelo aparente, que vivem e se multiplicam no interior de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) do hospedeiro vertebrado (SONADA, 2007; WHO, 2010). *Leishmania*, da mesma forma que outros tripanossomatídeos, possuem uma mitocôndria única e ramificada, que se estende por todo o corpo celular e tem um grande conteúdo de material genético localizado em uma região específica da organela, o cinetoplasto. O cinetoplasto é localizado em uma região vizinha ao corpo basal do flagelo, e é responsável pela síntese e armazenamento de uma molécula de DNA menor (minicírculo) e outra maior (maxicírculo), ambos presentes na mitocôndria (SIMPSON, 1986).

Os principais hospedeiros vertebrados de *Leishmania* são mamíferos pertencentes às ordens Edentata (tatus e preguiças), Carnivora (cães e gatos), Rodentia (ratos), Primata (humanos e não humanos) e Marsupialia (gambás). Com algumas exceções, as leishmanioses são zoonoses e a infecção em humanos é acidental (ASHFORD, 1996; SALIBA et al., 1999; GRAMICCIA et al., 2005; WHO, 2010).

As leishmanioses humanas podem apresentar distintas manifestações clínicas no hospedeiro vertebrado, sendo as duas formas clínicas básicas a leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (SILVEIRA et al., 2004; LAINSON & SHAW, 2005). A LT pode causar diversas síndromes clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania*, podendo ser divididas em leishmaniose cutânea; leishmaniose cutânea mucosa; leishmaniose cutânea difusa ou anérgica (CHAPPUIS et al., 2007).

Na leishmaniose cutânea, o indivíduo apresenta uma ou várias úlceras ou nódulos na pele, essa forma é considerada de menor importância. A leishmaniose cutânea mucosa, também conhecida como espúndida, causa ulcerações que são progressivamente destrutivas nas mucosas como boca, nariz, faringe e laringe, sendo considerada grave, causando a mutilação da face e provocando sofrimento para o paciente. A manifestação clínica que a leishmaniose cutânea difusa causa, são feridas não ulceradas, que apresentam grande quantidade de parasitos na pele do indivíduo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; CHAPPUIS et al., 2007).

A LT apresenta ampla distribuição mundial, estando presente em vários países. No continente americano, esta forma é denominada como leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo encontrados casos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (GONTIJO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; WHO, 2010).

A transmissão do parasito para o ser humano pode ser agrupado em duas categorias: zoonótica (em que ocorre do animal para o vetor e posteriormente para o hospedeiro humano e outros animais) e antroponótica (que ocorre quando o parasito é transmitido entre humanos, que atuam como hospedeiros e reservatórios, pelo inseto vetor) (DESJEUX, 2004; SECUNDINO et al., 2011; WHO, 2010).

As leishmanioses ocorrem em 98 países distribuídos em quatro, dos seis continentes. De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 310 milhões de pessoas estão expostas a contrair a doença, com incidência anual de aproximadamente 1,3 milhões de novos casos, e destes, 1 milhão com LT e 300.000 de pessoas acometidas pela LV (Figura 1), das quais cerca de 20.000 a 30.000 dos indivíduos doentes evoluem para o óbito. Cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em sete países: Bangladesh, Índia, Etiópia, Nepal, Sudão, Sudão do Sul e Brasil, e 90% dos casos da LT ocorrem em sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. (ALVAR et al., 2012; CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004; WHO, 2015, 2015).

As leishmanioses constituem atualmente, o segundo grupo de doenças parasitárias que mais mata no mundo, ficando atrás somente da malária. E está entre as mais importantes doenças infecciosas combatidas pela OMS (WHO, 2010).

Houve grande avanço nos últimos 10 anos em relação ao tratamento, prevenção e diagnóstico das leishmanioses, porém as altas taxas de mortalidade e morbidade ainda continuam apresentando um crescimento preocupante (WHO, 2010).

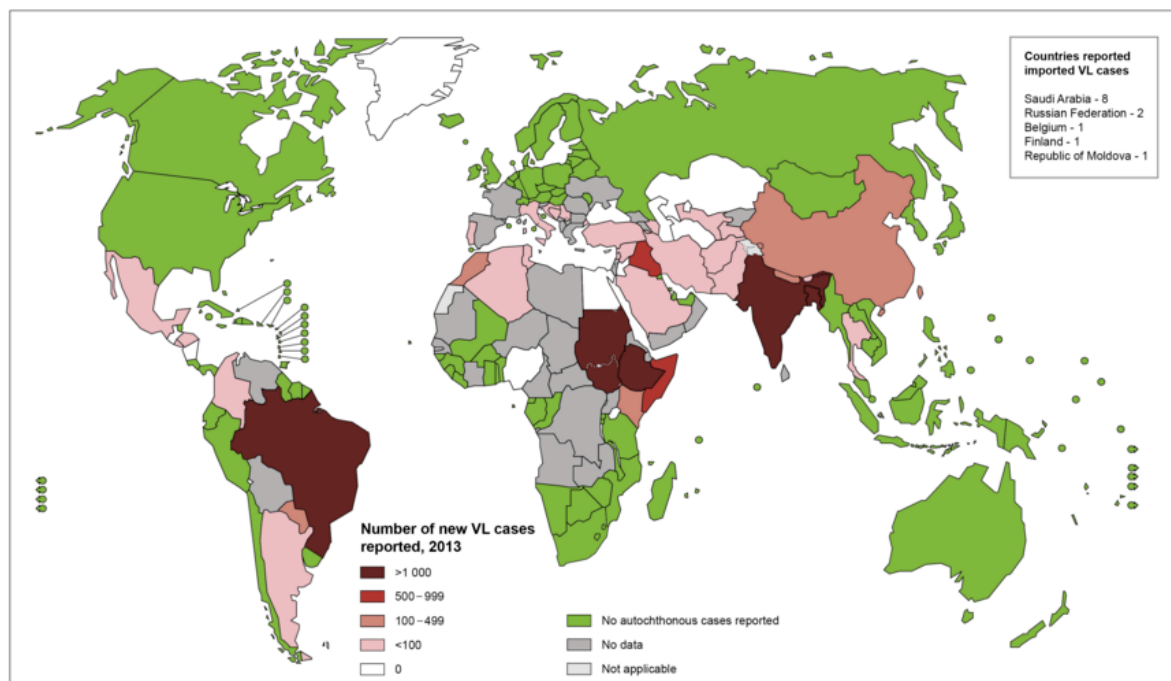


Figura 1 - Prevalência da Leishmaniose visceral no mundo, 2013. Fonte: OMS (2016).

1.2 Transmissão e Ciclo biológico

O gênero *Leishmania* possui ciclo de vida heteroxênico, necessitando de dois hospedeiros, sendo um invertebrado (representado pelo inseto) e um mamífero, (principalmente os membros da família Canidae, marsupiais, roedores e humanos) (LAINSON & SHAW, 1987) (Figura2). O gênero é dividido em dois subgêneros, de acordo com seu desenvolvimento no trato digestório do vetor, entre outros aspectos: *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*) (LAINSON & SHAW, 1987).

Os vetores das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (LAINSON & RANGEL, 2005; WHO, 2010). Os flebotomíneos são insetos pequenos e possuem o hábito de vida crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares protegidos e úmidos, sendo então encontrados em diferentes regiões geográficas com diferentes condições climáticas e ambientais. A maioria desses insetos habita o ambiente silvestre, porém pode se alimentar em homens e animais, cujas habitações estão próximas a regiões de mata. Somente as fêmeas dos flebotomíneos são

hematófagas. Algumas espécies apresentam acentuada antropofilia e domiciliação, o que as tornam epidemiologicamente importantes na transmissão de doenças (LAINSON & SHAW, 1998; MIRANDA & DIAS, 2011).

A maior concentração de espécies de flebotomíneos é encontrada nas florestas da América do Sul, no qual o gênero predominante é *Lutzomyia*. O gênero *Lutzomyia* é encontrado no Novo Mundo, e *Phlebotomus* é distribuído no Velho Mundo, nas zonas áridas e semiáridas. Apenas esses dois gêneros de flebotomíneos possuem importância médica, por serem os transmissores das leishmanioses (SCHLEIN, 1993; SACKS & KAMHAWI, 2001; KILLICK-KENDRICK, 1990).

O parasito é transmitido quando fêmeas adultas de flebotomíneos, ao realizar repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, ingerem as formas amastigotas, presentes nas células do SMF da pele do mesmo. No intestino do vetor as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas procíclicas flageladas que se replicam intensamente. As promastigotas passam por um processo de metaciclogênese no tubo digestório do vetor, onde ocorrem mudanças morfológicas e fisiológicas, originando as formas promastigotas metacíclicas infectantes. Essas formas se direcionam para a cavidade bucal do inseto, onde são introduzidas no novo hospedeiro durante o repasto (COURA, 2005; PIMENTA et al., 1992; SACKS & SHER, 2002; SOARES et al., 2005).

As promastigotas metacíclicas, no tubo digestório do inseto vetor, produzem uma glicoproteína de consistência gelatinosa chamada PSG (*promastigote secretory gel*). Acredita-se que esse gel obstrua a passagem de alimento, quando há o repasto sanguíneo-tissular, o flebotomíneo é obrigado a regurgitar saliva juntamente com as formas promastigotas metacíclicas no local da picada (BATES, 2007).

Após a infecção, os macrófagos atraídos pela reação inflamatória formada no local, fagocitam os parasitos, que são internalizados no vacúolo parasitóforo, que se liga aos lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal. No interior deste vacúolo, o parasito permanece em um ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais e metabólitos reativos do oxigênio. Entre uma a quatro horas, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, iniciando uma reprodução por divisão binária dentro do vacúolo parasitóforo. Quando os macrófagos estão repletos com amastigotas, eles se rompem e liberam os parasitos que vão infectar outros macrófagos (PETERS et al., 2008; PIMENTA et al., 2012; SACKS & SHER, 2002).

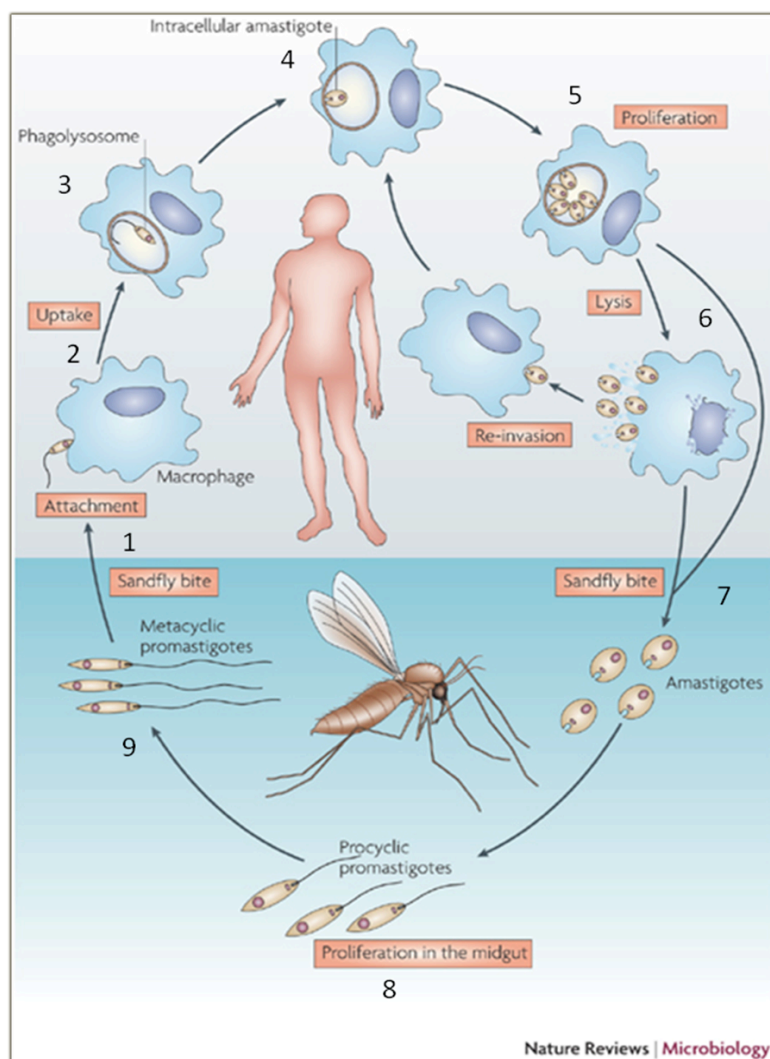


Figura 2 - Representação do ciclo de vida de *Leishmania* spp (Adaptado de Chappuis et al., 2007). (1) inoculação de promastigotas durante o repasto sanguíneo; (2) promastigotas fagocitadas pelas células do SMF; (3) parasitos são internalizados no vacúolo parasitóforo, que se liga aos lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal; (4) diferenciação de promastigotas em amastigotas intracelular; (5) multiplicação das amastigotas; (6) ruptura das células liberando as formas amastigotas que vão infectar novas células; (7) Repasto sanguíneo, ingestão de macrófagos infectados pelo inseto vetor; (8) transformação das amastigotas em promastigotas no intestino do vetor; (9) Divisão e migração para a cavidade bucal do inseto.

1.3 Leishmaniose visceral

As manifestações clínicas associadas a LV são atribuídas a parasitos pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, que é representado pelas espécies *L. (Leishmania) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (LAINSON & SHAW, 1987; MAURICIO et al., 2001; WHO 2010). *L. infantum* e *L. chagasi* de várias regiões geográficas possuem diferenças mínimas, não tendo sido possível a distinção entre elas por estudos bioquímicos e moleculares. Assim, autores sugerem que as duas espécies devem ser consideradas como um grupo monofilético, adotando *L. chagasi* como sinonímia de *L. infantum* (MAURICIO et al., 2001). De acordo com a OMS, o status de *L. chagasi* como espécie ainda se encontra em discussão, e alguns autores sugerem a nomenclatura *L. (L.) infantum chagasi* (WHO, 2010; SHAW, 2006). Neste trabalho adotaremos *L. infantum* como agente etiológico da LV no Brasil.

A LV é endêmica em 70 países, localizados nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África, América Central e América do Sul. *Leishmania infantum* é o agente etiológico da LV zoonótica, enquanto a *L. donovani* causa a LV antroponótica (WHO, 2010). É uma doença sistêmica grave que atinge as células do SMF e órgãos de hospedeiros vertebrados, sendo o baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele, as regiões mais afetadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014)

O período de incubação da doença pode variar de meses a anos, durante o qual o parasito se dissemina pelo corpo (OLIVA et al., 2006). As manifestações clínicas são semelhantes em cães e humanos, sendo caracterizada pelos seguintes sintomas: surtos intermitentes de febre, tosse, perda de peso, letargia, aumento do baço e do fígado, anemia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, linfadenopatia, epistaxe, diarréias e edemas (ARTAN et al., 2006; DEL OLMO et al., 2009; REUS et al., 2005; WHO, 2010). Porém, o surgimento da doença e sua evolução, são conseqüências de um complexo de interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (MANNA et al., 2006).

A grande importância da LV na saúde pública se deve a expansão geográfica para áreas até então livres da doença, e inclui ainda a urbanização, reemergência em focos endêmicos antigos e alta letalidade em humanos, principalmente nos indivíduos não tratados ou com tratamentos tardios, além de casos de crianças desnutridas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Quando não tratada, essa doença pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WHO, 2010).

1.4 Leishmaniose visceral no Brasil

Durante o período de 2001 à 2011, foram relatados nas Américas cerca de 38.808 casos de LV, sendo que 96,6% destes casos foram notificados no Brasil. Até a década de 90, a região Nordeste do país apresentava cerca de 90% dos casos, porém houve uma expansão da doença para regiões onde não havia casos notificados antes, como Centro Oeste, Sudeste e Norte (BEVILACQUA et al., 2001; BRASIL, 2005; PAHO, 2013).

No Brasil, entre 2007 a 2011, foram notificados e confirmados 19.016 casos de LV. Os estados com maiores números de casos notificados foram: Ceará (2.948), Minas Gerais (2.803), Maranhão (2.357), Tocantins (2.177), Pará (1.738), Bahia (1.589), São Paulo (1.201), Mato Grosso do Sul (1.165) e Piauí (1.068) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Na área urbana, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório do parasito. No ambiente silvestre, os reservatórios mais comuns são as raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cercopithecus*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão de *L. infantum*: *Lutzomyia longipalpis*, a principal transmissora e *L. cruzi*, como possível vetor no Estado de Mato Grosso do Sul e, dependendo da localização geográfica, são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (WHO, 2010; MISSAWA et al., 2011).

A LV era caracterizada como uma doença eminentemente rural, mas a partir dos anos 1980, observou-se a expansão dessa doença para regiões periurbanas de municípios de médio e grande porte, acometendo pessoas que possuem baixo nível socioeconômico e que vivem em condições precárias de moradias (PASTORINO et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2005). A doença acomete principalmente crianças menores de 10 anos. As crianças são mais suscetíveis devido à imaturidade imunológica celular acentuada pela desnutrição, que é um fator comum em áreas endêmicas para essa parasitose, e também pelo fato de estarem mais expostas ao inseto vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Fatores como a urbanização crescente, o intenso processo migratório, o desmatamento desordenado, as péssimas condições socioeconômicas, a presença de cães domésticos susceptíveis a infecção, e a migração de populações não imunes para regiões endêmicas, contribuem com a expansão da LV e com o aparecimento de novos focos (CAMARGO-NEVES, et al., 2001; BEVILACQUA, et al., 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; ROSAS FILHO & SILVEIRA, 2007).

No interior do país, a urbanização da LV associada ao avanço da infecção pelo HIV, tem contribuído com o aumento do número de casos de coinfeção *L. infantum*/HIV. O número de casos de coinfeção tem aumentado significativamente, entre os anos de 2007 e 2011, com média de 199 casos/ano, que representam um aumento de 94,7% em relação aos notificados em 2001 (21 casos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Em razão das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da LV no Brasil, associado a questões de ordem operacional, as estratégias de controle desta endemia têm se mostrado pouco efetivas. Estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotomíneos vetores, eliminação dos reservatórios domésticos e atividades de educação em saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os controles dos reservatórios e do inseto vetor representam os maiores desafios para o controle da LV, dada a necessidade de melhor conhecer o comportamento do vetor no ambiente urbano, as dificuldades operacionais inerentes a eutanásia de cães soropositivos e o alto custo de execução dessas estratégias. Além do controle de vetores e reservatórios, a vigilância da LV visa reduzir a morbidade da doença e as taxas de mortalidade, através de diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

1.5 Quimioterapia convencional das leishmanioses e suas limitações

A OMS recomenda o diagnóstico e o tratamento adequado, como as principais formas de controle das leishmanioses que acometem os seres humanos (WHO, 2010).

O tratamento deve ser realizado após a confirmação da doença, sendo os medicamentos de primeira escolha no Brasil e no mundo os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), havendo dois tipos que são utilizados: antimoniato de N-metil d-glucamina

(AM) empregado a mais de 60 anos no país, e estibogluconato de sódio, que não é comercializado no Brasil. Estes compostos agem inibindo enzimas do parasito que são utilizadas na oxidação de ácidos graxos e glicólico, resultando na depleção dos níveis de ATP intracelular, além da redução do antimônio pentavalente para trivalente (Sb^{5+} em Sb^{3+}), a forma tóxica para os parasitos, capaz de interferir no metabolismo dos tióis (BALANA-FOUCE et al., 1998). A dose recomendada dos antimoniais deve ser calculada em mg Sb^{5+} /kg/dia (WHO, 2010).

Embora os antimoniais sejam o medicamento de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, seu uso clínico apresenta diversas limitações, como a necessidade de administração parenteral diariamente e durante três ou mais semanas, e efeitos colaterais como náusea, vômito, fraqueza, cólica abdominal, mialgia, diarreia, hepatotoxicidade, erupções cutâneas e cardiotoxicidade (MARSDEN, 1985; RODRIGUES et al., 1999). Além disso, o AM não deve ser administrado em gestantes, pois atravessa a barreira transplacentária, podendo impregnar no tecido nervoso do feto, levando a síndromes de retardamento mental. Também há restrições do uso deste fármaco em pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Se o paciente não apresentar melhora em seu quadro clínico com a utilização dos antimoniais, ou se o uso desses medicamentos for impossibilitado devido aos motivos citados anteriormente, é utilizado como tratamento alternativo a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Anfotericina B é considerada como droga leishmanicida mais eficaz disponível comercialmente. É um antibiótico da classe dos poliênicos, e é produzida a partir do *Streptomyces nodosus*. Esse medicamento é primariamente uma droga fungicida, que possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp., no qual age nas formas promastigotas e amastigotas do parasito, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Sendo o seu mecanismo de ação, a ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol), que estão presentes na membrana plasmática do parasito (FILIPPIN, 2006).

O Ministério da Saúde disponibiliza duas apresentações de anfotericina B: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal, sendo a eficácia dessas apresentações comparáveis, porém a anfotericina B lipossomal apresenta uma menor toxicidade (MEYERHOFF, 1998). De maneira geral o paciente em tratamento com

anfotericina B pode apresentar febre, cefaléia, náusea, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar. Além desses efeitos colaterais citados, o desoxicolato de anfotericina B também pode causar anorexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, comprometimento da função renal, e distúrbios de comportamento. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Todos os pacientes em tratamento com esses fármacos devem ser acompanhados por equipe médica, em regime de internação, para monitorar efeitos colaterais das drogas.

Outro medicamento utilizado no tratamento das leishmanioses é a hexadecilfosfocolina (miltefosina). Inicialmente, este fármaco foi desenvolvido como droga antineoplásica e foi o primeiro medicamento a ser administrado por via oral com eficácia no tratamento da LV. Este medicamento é usado em alguns países tanto para o tratamento da LV quanto para a LT (SINDERMAN et al., 2004; BHATTACHARYA et al., 2007).

A miltefosina possui a capacidade de interferir na membrana celular do parasito, sem que haja interação com o DNA, e depois dessa interferência, o fármaco altera a permeabilidade, a composição lipídica e a fluidez da membrana fazendo com que haja apoptose (PARIS, et al., 2004; VERMA; DEY, 2004). Este medicamento apresenta efeitos colaterais como nefrotoxicidade, teratogenicidade, problemas gastrointestinais devido a sua administração por via oral. Também apresenta meia-vida prolongada, que acaba favorecendo a seleção de parasitos resistentes a droga (BHATTACHARYA et al., 2007). Em razão dessa limitação, uma formulação intravenosa capaz de concentrar a droga nos órgãos ricos em células do SMF, que são alvos naturais do parasito (fígado, baço, medula óssea, linfonodos, dentre outros) é de grande interesse principalmente para pacientes que têm perturbações gastrointestinais (PAPAGIANNAROS et al., 2005).

De maneira geral seria interessante a combinação da miltefosina com outros fármacos leishmanicidas, como os antimoniais, principalmente nos pacientes não responsivos aos protocolos terapêuticos convencionais (WHO, 2010). Como vantagens terapêuticas, a associação dessas drogas poderia apresentar maior eficácia em pacientes refratários à terapia convencional, menos efeitos colaterais, baixa toxicidade e menor tempo de tratamento (GRIENSVEN, 2010).

1.6 Lipossomas como nanocarreadores de fármacos para o tratamento das leishmanioses

Os lipossomas são vesículas esféricas, podendo apresentar uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (FRÉZARD et al., 2005).

Os lipossomas possuem tendência a serem fagocitados pelos macrófagos do baço, fígado e medula óssea, que são os locais onde há uma maior densidade de parasitos causadores da LV. Por tanto, sistemas nanoestruturados são ideais para o direcionamento de medicamentos para esses locais (FRÉZARD et al., 2005). O medicamento AmBisome®, formulação de anfotericina B em lipossomas, explorou essa propriedade, e foi utilizado com sucesso no tratamento de pacientes não responsivos aos fármacos antimoniais, sem efeitos colaterais. Esse medicamento foi aprovado pela agência reguladora americana “Food and Drug Administration – FDA” como a primeira à base de lipossomas a ser reconhecida para tratamento da LV, devido a sua eficácia de 100% em pacientes imunocompetentes (MEYERHOFF, 1999). Porém, a dose terapêutica que é recomendada pelo Ministério da Saúde do Brasil para o tratamento da LV (3-4mg/kg/dia/5-7 dias), e o elevado custo dessa formulação, calculado em cerca de R\$ 55000,00/paciente de 70 kg, tornou-se inviável o uso desse medicamento em larga escala (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A maior vantagem em se utilizar formulações lipossomais quando comparado a outros sistemas carreadores de fármacos é devido a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando constituídos por lipídeos pertencentes às famílias de lipídeos naturais, como o colesterol. E ainda são sistemas altamente versáteis, podendo incorporar substâncias lipofílicas e hidrofílicas, cujo tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados de acordo com a função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos (FRÉZARD et al., 2005).

Como exemplo dessa versatilidade, alguns autores relataram que, ao adicionar lipídeo com cabeça polar constituída de polímero de etileno glicol (PEG) na membrana das vesículas de formulações lipossomais, essa formulação permaneceria por um período maior na circulação sanguínea. Foi dado o nome de lipossomas furtivos, peguilados ou estabilizados estericamente, a esse tipo de formulação (ALLEN; HANSEN, 1991). A incorporação do PEG na formulação leva a uma redução na

opsonização das vesículas e menor velocidade de captação pelos macrófagos do SMF da medula óssea, fígado e baço, promovendo a circulação prolongada da formulação e aumentando os sítios de ligação nos locais da inflamação/infecção (ALLEN & HANSEN, 1991; FRÉZARD et al., 2005).

Uma nova abordagem para o tratamento das leishmanioses é combinação de fármacos, que visam melhorar os efeitos da terapia individual desses medicamentos (SEIFERT, 2006). Uma estratégia é a utilização de mais de um fármaco em uma mesma formulação lipossomal ou mistura de formulações lipossomais com diferentes fármacos (FREZARD et al., 2012). Recentemente, foi demonstrado que AM em uma mistura de lipossomas convencional e peguillado apresentaram resultados promissores quando comparados com AM livre. Essa mistura foi capaz de promover uma maior redução da carga parasitaria na medula óssea, baço e fígado de camundongos experimentalmente infectados quando comparado com as formulações utilizadas sozinhas (AZEVEDO et al, 2014).

2 Justificativa

A LV é considerada, dentre as doenças negligenciadas, a que se encontra em maior expansão, causando impacto e prejuízos na saúde pública. Nos últimos anos, a doença se expandiu para diversas áreas urbanas até então livres desta parasitose. Em razão disso, OMS considera o controle da LV como prioridade máxima, sendo a principal medida, o tratamento dos indivíduos doentes (WHO, 2010).

Há mais de 70 anos os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (AM). Recentemente, a miltefosina foi o primeiro fármaco oral aprovado para o tratamento de LV. Entretanto, ambos apresentam importantes limitações relacionadas à toxicidade elevada e seleção de parasitos resistentes. Por isso, a OMS tem realizado importante esforço ao longo das últimas décadas, incentivando e financiando estudos que viabilizem avanços na área de tratamento, quer seja para descoberta de novos produtos, fármacos e formulações, quer seja pela melhora das metodologias de tratamento já existentes (WHO, 2010).

Indo ao encontro a essa demanda, o GPDML – Grupo De Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos Leishmanicidas – tem investido no emprego da

nanotecnologia, em especial nas formulações lipossomais nanoestruturadas, para o tratamento das leishmanioses, sendo reconhecidamente referência na área e apresentando resultados promissores ao longo dos anos. Recentemente, o GPDML depositou pedido de patente referente à mistura de lipossomas de circulação prolongada e convencionais contendo fármacos leishmanicidas para o tratamento da LV (FREZARD et al., 2012).

O uso de lipossomas de circulação prolongada para o tratamento da LV permite direcionamento mais eficaz e prolongado de fármacos leishmanicidas para os órgãos de acesso mais difícil, como medula óssea e pele, enquanto lipossomas convencionais proporcionam maior direcionamento e acúmulo dos fármacos no fígado e baço, órgãos com maior densidade parasitária, em indivíduos com LV. Além disso, o uso dessas formulações possibilita menor toxicidade e doses terapêuticas inferiores do que as utilizadas convencionalmente, o que pode levar a um menor risco de seleção de parasitos resistentes aos fármacos, um dos principais problemas relacionados ao tratamento da LV.

Não foram registrados na literatura, até o momento, ensaios que avaliassem, *in vivo*, a eficácia de uma formulação lipossomal nanoestruturada de circulação prolongada contendo miltefosina para o tratamento da LV. Da mesma forma, não há registros do uso de dois medicamentos leishmanicidas (miltefosina e antimoniato de meglumina) para o tratamento de LV, em uma mesma vesícula lipossomal de circulação prolongada ou na mistura de lipossomas convencionais e de circulação prolongada. Sendo assim, o presente projeto propõe avaliar a eficácia de estratégias terapêuticas inovadoras para o tratamento dessa importante doença, fundamentadas em sistema entregador de fármacos, composto por formulação lipossomal de ação prolongada contendo miltefosina, ou miltefosina e AM, além da mistura de lipossomas de ação prolongada e convencionais contendo miltefosina e AM, respectivamente, para o tratamento da LV.

Esperamos que os nossos resultados proporcionem um avanço no estudo e no tratamento da LV, aumentando a eficácia, reduzindo a toxicidade e minimizando a possibilidade de seleção de parasitos resistentes aos fármacos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Preparar, caracterizar e avaliar a eficácia, *in vitro* e *in vivo*, de formulações lipossomais de ação prolongada contendo miltefosina na presença ou ausência de antimoniato de meglumina para tratamento da leishmaniose visceral.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar formulação lipossomal de ação prolongada contendo miltefosina.
- Preparar e caracterizar formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de ação prolongada contendo miltefosina.
- Avaliar a citotoxicidade e eficácia dessas formulações, *in vitro*, sobre *Leishmania infantum*.
- Avaliar a toxicidade dessas formulações, *in vivo*.
- Avaliar a eficácia dessas formulações de forma individual e na mistura de lipossomas de ação prolongada e convencionais contendo miltefosina e AM, respectivamente, *in vivo*, utilizando modelo experimental de LV.

4 Material e Métodos

4.1 Parasitos

Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa de referência da Organização Mundial de Saúde (OMS) *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1967/BH46), proveniente do criobanco de células e parasitos do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* - Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM/UFU), coordenado pelo professor Sydnei Magno da Silva.

4.2 Animais

Todos os procedimentos de manipulação dos animais estão em acordo com os princípios éticos da experimentação animal, e foram aprovados pelo Comitê de Ética na

Experimentação Animal da UFU - CEUA/UFU (Protocolo CEUA/UFU nº 069/2013) (ANEXO 1).

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal - CBEA/UFU.

Os animais foram mantidos no CBEA/UFU, sobre condições adequadas de manejo técnico, com água e alimentação *ad libitum*, de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Medicina Veterinária, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, e *Principles of Laboratory Animal Care* – NIH/EUA.

4.3 Isolamento e Manutenção de *Leishmania infantum*

Os parasitos foram mantidos em meio de cultura α -MEM (Minimum Essential Medium) completo (α -MEM (Sigma Aldrich Inc., EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, EUA), 2mM L-glutamina (Sigma Aldrich Inc., EUA), 100U μ g/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, 1% v/v BME vitamins (Sigma Aldrich Inc., EUA) e incubadas em estufa BOD (Demanda Biológica de Oxigênio, Incubadora Refrigerada, LUCA-161/01, Lucadema, Brasil) a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ em garrafas plásticas de cultura celular de 25cm² (Sarsted AG &Co., Alemanha). A cada cinco dias, foram realizadas subculturas (repiques).

Camundongos BALB/c foram utilizados para a manutenção *in vivo* da cepa. De acordo com a necessidade dos experimentos os camundongos foram inoculados, por via intraperitoneal (IP), com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de crescimento. Um mês após a infecção, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestesia geral, o baço retirado de forma asséptica, homogeneizado em 1mL de meio α -MEM completo e o conteúdo transferido para garrafas plásticas de cultura celular contendo meio α -MEM completo, que foram mantidas em estufa BOD a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$. A cada 10 dias, foi retirada uma alíquota (10 μ L) da cultura, analisada por microscopia óptica (40X), para a verificação da presença de parasitos viáveis. Confirmado o isolamento dos parasitos, a cultura era expandida conforme a necessidade dos experimentos ou criopreservada em nitrogênio líquido, e mantida no criobanco de células e parasitos do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*. Em todos os ensaios foram utilizados parasitos até a quinta passagem, para preservar suas características de virulência.

4.4 Curvas de crescimento de *Leishmania infantum* em meio de cultura

A avaliação do desenvolvimento e multiplicação das formas promastigotas de *L. infantum* em meio de cultura foi realizada através da curva de crescimento. Para realização da contagem, as promastigotas foram diluídas em uma solução de ISOTON (ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,12 M, formaldeído 0,5 % v/v, pH 7.2) contendo mesmo volume de solução de azul de tripan 0,4% em PBS (pH 7.2), e então aplicadas em câmara hemocitométrica (câmara de Neubauer). A contagem das promastigotas foi feita em microscópio óptico (40X) e a média aritmética dos quatro quadrantes para contagem de parasitos viáveis era obtida e multiplicada pelo inverso da diluição em ISOTON e novamente multiplicada por 10000, o fator de correção da câmara, para a obtenção do número de parasitos por mililitro de cultura. A contagem foi realizada por 10 dias consecutivos, sempre no mesmo horário.

4.5 Preparo das formulações

O preparo e caracterização das formulações lipossomais foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados - LabNano/ICB/UFG, sob a supervisão do professor Frederic Frézard.

4.5.1 Antimoniato de meglumina

O preparo do AM foi realizada de acordo com metodologia proposta por Demicheli et al. (2003), utilizando quantidades equimolares de N-metil-D-glucamina e pentacloro de antimônio (Sigma Aldrich Inc., EUA). O composto obtido foi caracterizado quimicamente como antimoniato de meglumina com teor de Sb de 28% m/m, determinado por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (AA600, Perkin Elmer, EUA) no LabNano/UFG.

4.5.2 Lipossomas convencionais contendo AM

O preparo do AM encapsulado em lipossomas convencionais (LAM) foi realizado de acordo com Schettini et al. (2006); Ribeiro et al. (2008); da Silva et al. (2012), com modificações. Inicialmente foram preparados lipossomas convencionais do tipo SUV (Small unilamellar vesicles) constituídos por diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) (Lipoid, Alemanha), colesterol (CHOL) e dicetilfosfato (DCP) (Sigma Aldrich Inc., EUA), utilizando razão molar de 5:4:1 e concentração final de lipídeo de 55g/L. O filme lipídico foi ressuspenso em PBS, e foram realizadas extrusões em membrana de

policarbonato de 100nm de diâmetro em extrusor de lipídeos (Lipex Biomembranes, Inc. Canadá). Em seguida, a suspensão foi liofilizada por 72h (Liofilizador modelo FreeZone 4.5, Labconco Corp., EUA). Os lipossomas liofilizados foram reidratados com solução aquosa de AM (80g de Sb/L) e o AM encapsulado em lipossomas foi separado daquele não encapsulado por centrifugação por 30min a 25000 x g (Centrífuga Jouan MR 23i, St-Herblain, França). O sedimento, formado pelo AM encapsulado em lipossomas, foi lavado duas vezes, submetido a nova extrusão (200nm) e ressuspensionado com solução salina estéril. Aliquotas da suspensão final foram utilizadas para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas, índice de polidispersão e potencial zeta, por meio de espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS90). A taxa de encapsulação de Sb nas vesículas foi determinada por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (AA600, Perkin Elmer, EUA) (SCHETTINI et al., 2006).

4.5.3 Lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG)

A metodologia de preparo das formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina foi realizada de acordo com Porta (2015-dados não publicados). Foi utilizada a metodologia de “Desidratação e reidratação de vesículas” ou DRV (Deydration Rehydration vesicles), utilizando miltefosina (HePC) (Sigma Aldrich Inc., EUA) e os seguintes lipídeos: CHOL, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Sigma Aldrich Inc., EUA), diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG2000) (Avanti Polar Lipids, EUA) e DCP.

A razão molar utilizada para o preparo da formulação foi 0,4:0,6:0,8:0,2:0,1 para HePC:DPPC:CHOL:DCP:DSPE-PEG 2000 em concentração final de lipídeos de 55g/L. Inicialmente os lipídios foram solubilizados em clorofórmio (CH_3Cl)/formaldeído (CH_2O) e a solução submetida a evaporação dos solventes em rotaevaporador com vácuo, a temperatura de 65°C por 60 minutos. O processo gerou filme lipídico composto por vesículas multilamelares (MLV's - Multilamellar vesicles), que foi hidratado com água ultrapura (Milli-Q[®] Reference, Merck Millipore Co., Alemanha) a 65°C por 60 minutos. A suspensão foi submetida à extrusão em membrana de policarbonato (100nm) para obtenção de vesículas unilamelares pequenas (SUVs), seguido de adição de solução de NaCl 0,3M, congelamento em nitrogênio líquido e subsequente liofilização durante 72h. O liofilizado foi então reconstituído com solução

de PBS e submetido à nova extrusão (200nm). A suspensão foi centrifugada (25000 x g, 60 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em PBS estéril e a suspensão resultante armazenada a 4°C até o momento do uso.

Alíquotas da suspensão final foram utilizadas para determinar as principais características (diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e pH) da amostra por meio de espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS90).

4.5.4 Lipossomas peguilados contendo miltefosina e AM (HePC-PEG/AM)

As vesículas HePC-PEG foram preparadas utilizando os mesmos lipídeos e razão molar descritos acima. A suspensão de SUVs foi reidratada com solução aquosa de AM (Sb^{5+} a 32g/L), congelamento e liofilização. O liofilizado foi reidratado com PBS e a suspensão submetida à extrusão (200 nm) e centrifugações (25000 x g, 60 min, 4°C), a fim de separar o AM não encapsulado. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em PBS estéril e a suspensão de lipossomas foi armazenada a 4°C até o uso. Além da caracterização das vesículas por espectroscopia de correlação de fótons, a eficiência de encapsulação do Sb foi determinada por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite.

4.5.5 Detecção de HePC nas formulações peguiladas por cromatografia em camada delgada

Para confirmar a incorporação da miltefosina nas formulações lipossomais, foi realizada análise por cromatografia em camada delgada (CCD), de acordo com metodologia de Kaufmann-Kolle et al. (1994), com modificações.

Inicialmente os constituintes das vesículas lipossomais peguiladas - HePC, DPPC, CHOL, DCP e DSPE-PEG 2000 – foram solubilizados em mistura de clorofórmio (CHCl_3)/metanol (CH_3OH) (1:1 v/v), em volume correspondente a concentração utilizada para o preparo das formulações. A seguir, 5 μL de cada amostra solubilizada e das formulações HePC-PEG, HePC-PEG/AM sem solubilização nos solventes orgânicos, foram aplicados em cromatoplas de sílica gel 60 (Sigma-Aldrich Inc., EUA). Com o objetivo de verificar se havia perda de HePC da formulação peguilada para a fase aquosa da suspensão, alíquotas das formulações foram centrifugadas (10.000 x g, 2 minutos) (Centrifuga HERMLE 2323 K, HERMLE LaborThechnik, Alemanha) e 5 μL do sobrenadante foi aplicado na cromatoplas. Foi

utilizado como fase móvel, mistura de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{trietilamina}/\text{H}_2\text{O}$ (30:35:34:8 por volume), e a revelação foi feita com solução de CuSO_4 (10% p/v) em H_3PO_4 (8% v/v) seguido de aquecimento a 180°C.

4.6 Estudo da atividade leishmanicida in vitro

4.6.1 Eficácia das formulações sobre a viabilidade das formas promastigotas de *Leishmania infantum*

A concentração inibidora (CI_{50}) das formulações para promastigotas de *L. infantum* foi avaliada por ensaio de viabilidade celular à base de resazurina (CORRAL et al., 2013). Promastigotas em fase logarítmica de crescimento ($2,5 \times 10^5$ parasitos/poço) foram semeadas em placas de cultura celular de 96 poços (Sarsted AG &Co., Alemanha) em meio RPMI 1640 completo (meio RPMI 1640 – Sigma Aldrich Inc., EUA – suplementado com 10% de SFB, 2mM L-glutamina, 100U $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina) e incubadas a 26°C com uma atmosfera de 5% de CO_2 (CO_2 Incubator MCO-19IAUV-PA, Panasonic Corp., Japão). As formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM, e a miltefosina comercial (Sigma-Aldrich, Inc., EUA) foram diluídas de forma seriada, na razão 2, em meio RPMI 1640 completo nas concentrações de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ até 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, baseado na concentração de miltefosina nas formulações. A formulação LAM foi diluída no volume correspondente a mesma concentração de Sb da formulação HePC-PEG/AM. O AM livre foi testado de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Parasitos não tratados foram utilizados para comparação da viabilidade. As formulações foram então incubadas durante 72h. Após incubação foi adicionada solução de resazurina (0,15mg/mL em PBS) na relação de 10% v/v (Sigma-Aldrich Inc., EUA) nos poços, e as placas foram incubadas durante 4h a 26°C com atmosfera de 5% de CO_2 . Em seguida, a intensidade de fluorescência (Spectramax M2, Molecular Devices LLC, EUA) foi determinada utilizando os seguintes comprimentos de ondas: 550 nm de excitação e 590 nm de emissão. A intensidade de fluorescência foi expressa em unidades arbitrárias e utilizada para o cálculo da viabilidade celular.

Foram realizados três experimentos independentes, com as amostras testadas em triplicata. A concentração citotóxica (CI_{50}) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da intensidade de fluorescência em relação ao controle (parasitos incubados com

RPMI 1640 completo, considerado 100% de viabilidade), calculada por análise de regressão.

4.6.2 Estudo da citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (machos, 8 semanas). As células foram elicitadas com injeção intraperitoneal de 2mL de tioglicolato 3% p/v (Sigma-Aldrich Inc., EUA) e após 72h, os camundongos foram eutanasiados, o lavado da cavidade peritoneal (com meio RPMI 1640 incompleto) foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos a 4°C (Centrifuga HERMLE, modelo 2323 K, HERMLE LaborTechnik, Alemanha), o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspensionado em meio RPMI 1640 completo (ZHANG et al., 2008). As células foram quantificadas em câmara hemocitométrica com o auxílio do corante vital azul de tripan (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,4% p/v.

Os macrófagos foram incubados em placa de 96 poços, com a concentração ajustada para 5×10^5 macrófagos/poço em meio RPMI 1640 completo. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 4 horas, e os poços lavados três vezes com meio RPMI 1640, para remover células não aderidas (TEMPONE et al., 2004).

Os macrófagos foram expostos as formulações diluídas nas concentrações de 160µg/mL até 2,5µg/mL para miltefosina, HePC-PEG, HePC-PEG/AM (160-2,5µg/mL correspondente a concentração de miltefosina nas formulações), LAM (mesmo volume calculado para miltefosina), e 400µg/mL a 12,5µg/mL para o AM livre em meio RPMI 1640 completo. Como controles do experimento, foram utilizados macrófagos incubados somente na presença de RPMI 1640 completo. As culturas de macrófagos permaneceram expostas as formulações durante 72 horas (37°C, 5% de CO₂).

A citotoxicidade das formulações foi avaliada através do método colorimétrico MTT (3 (4,5-demetiltiazol-2-il]-2,5- difenil tetrazolium) que interagiu somente com as células viáveis presentes no meio de cultura. A seguir as placas foram incubadas (37°C, 5% de CO₂, 4h), e o sobrenadante removido, adicionando DMSO (Sigma-Aldrich Inc., EUA) a fim de solubilizar os cristais de formazan. A absorbância correspondente a cada amostra foi então determinada em espectrofotômetro a 570nm (MOSMAN, 1983; TEMPONE et al., 2004). Foram realizados três experimentos independentes, com as amostras testadas em triplicata.

A concentração citotóxica (CC₅₀) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de MTT em relação ao controle (macrófagos incubados com RPMI 1640 completo, considerado 100% de viabilidade), calculada por análise de regressão.

4.6.3 Ensaios de eficácia contra amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum*

Culturas de promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária de crescimento foram ressuspensas em meio RPMI 1640 completo. Os parasitos (5x10⁶/poço) foram colocados para interagir com macrófagos murinos, previamente incubados (37°C, 5% de CO₂, 4 horas), em placas de 24 poços (Sarsted AG &Co., Alemanha), contendo uma lamínula estéril, com 13mm de diâmetro, em formato circular na proporção de 10 promastigotas/macrófago/poço. As placas foram novamente incubadas por 4 horas (37°C, 5% de CO₂) e os poços lavados com meio RPMI 1640 completo, aquecido a 37°C, para remoção de promastigotas não internalizadas e células não aderidas (ESLAMI & TANNER, 1994).

As formulações foram diluídas em meio RPMI 1640 completo, em concentração baseada nos valores de CI₅₀ e CC₅₀, determinados nos ensaios dos itens 4.6.1 e 4.6.2 desse trabalho. Os macrófagos infectados foram então incubados por 72 horas (37°C, 5% de CO₂). Como controles do experimento, macrófagos infectados foram incubados somente com meio, e macrófagos não infectados com as drogas. Após a incubação as lamínulas foram retiradas dos poços, coradas por Panótico rápido (Laborclin[®], Laborclin Produtos para Laboratórios LTDA, Brasil), montadas em lâminas com o auxílio de Bálsamo do Canadá (Sigma-Aldrich Inc., EUA), e analisadas em microscópio ótico com objetiva de imersão.

Foi determinada a taxa de infecção dos macrófagos (número de macrófagos infectados/número de não infectados, após contagem de 300 macrófagos por lamínula, em triplicata) para as formulações e miltefosina livre, que foram comparadas com a taxa de infecção do controle sem as drogas (100% de infecção).

4.7 Ensaios de eficácia em modelo murino de LV

4.7.1 Biodistribuição e toxicidade das formulações lipossomais

Para avaliar a toxicidade aguda e biodistribuição das formulações lipossomais

foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, 8 semanas de idade e peso médio de 25mg, que foram tratados de acordo com os seguintes protocolos:

Grupo 1- 12 animais que receberam, por via intraperitoneal, dose única da formulação de HePC-PEG (correspondente a 7,5 mg/kg de miltefosina);

Grupo 2- 12 animais que receberam, por via intraperitoneal, dose única da formulação de HePC-PEG/AM (correspondente a 7,5mg/kg de miltefosina e 8,7mg/Kg de Sb);

Grupo 3- 12 animais, que receberam por via oral, dose única de miltefosina (7,5mg/kg);

Nos tempos zero, 12h, 24h, 48h e 96h, após o tratamento, os animais (n=3 por tempo, de cada um dos grupos) foram anestesiados com associação de quetamina (50mg/kg/intraperitoneal) e xilazina (10mg/kg/intraperitoneal) para coleta de 1mL de sangue e, após as coletas, foram eutanasiados, e o fígado, baço e medula óssea foram coletados, pesados e armazenados a -20°C, até o momento do uso.

Parte do sangue coletado foi transferida para um tubo de microcentrífuga com heparina, homogeneizada e centrifugada a 3000 x g por 10 minutos para separação do plasma, que foi congelado a -20°C até o momento das análises bioquímicas.

4.7.1.1 Ensaio de toxicidade aguda

Para avaliação da toxicidade aguda, alíquotas de plasma dos grupos tratados com HePC-PEG, HePC-PEG/AM e miltefosina, além do plasma de 30 camundongos que não receberam tratamento, utilizados como controles, foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL-UFMG), coordenado pelo professor Wagner Luiz Tafuri, para a realização dos seguintes exames: avaliação da função renal, pela determinação dos níveis séricos de uréia e creatinina; para a avaliação da função hepática, pela determinação dos níveis de transaminase pirúvica (TGP), transaminase oxalacética (TGO), proteínas totais e albumina. Os ensaios de bioquímica sérica foram realizados em analisador bioquímico semiautomático (Labquest, Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), utilizando kits comerciais para a determinação das funções hepática e renal.

4.7.1.2 Ensaio de biodistribuição do antimônio

A presença de antimônio (Sb^{5+}) no fígado e sangue foi utilizada como indicador indireto de alcance das formulações HePC-PEG/AM e na mistura LAM + HePC/PEG nestes órgãos e no sangue. A metodologia de determinação da presença do Sb no fígado e sangue foi realizada de acordo com Azevedo (2014).

O fígado foi homogeneizado em homogeneizador de tecidos (PT 1600E, Fisher Scientific, EUA). Cerca de 1g do homogeneizado foi pesado e transferido para um tubo plástico de 15 mL contendo 2 mL de PBS. A mistura foi homogeneizada e aproximadamente 200 mg transferida para tubo de ensaio de vidro para a digestão. Em seguida, foi acrescentado ao tubo 2 mL de HNO_3 65% (v/v) e a mistura resultante foi aquecida a 70°C por 2 h em um bloco digestor (MA 400, Marconi, São Paulo, Brasil). Após este período, o tubo foi resfriado a temperatura ambiente, seguido da adição de 400 μL de H_2O_2 30% (v/v). A seguir o tubo foi aquecido por 2h a 70°C. O conteúdo do tubo foi então transferido, de forma quantitativa, para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com solução de HNO_3 a 0,2%.

Parte do sangue total coletado nos ensaios de toxicidade foi transferida para um tubo de ensaio de vidro e foi diluído diretamente em HNO_3 0,2% (v/v) na proporção de 1:40.

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.

Após a digestão, as amostras foram submetidas a espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite para a determinação da concentração do Sb, por análise de regressão a partir de uma curva de calibração. Para construir a curva padrão, concentrações conhecidas de uma solução de Sb (80g/L) foram acrescentadas em amostras do tecido a ser avaliado (fígado ou sangue) proveniente de camundongos não tratados. Os procedimentos de digestão e análise por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite foram os mesmos descritos previamente. Os resultados foram expressados em micrograma de Sb por grama de tecido hepático e micrograma de Sb por litro de sangue.

4.7.2 Teste de eficácia em modelo murino

Para os ensaios *in vivo* de eficácia terapêutica das formulações, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, 8 semanas de idade e peso variando entre 20 - 25mg. Os animais foram infectados com 10^7 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* (MHOM/BR/1967/BH46), por via intraperitoneal (IP) (dia 0).

Quinze dias após a infecção (dia 16), os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos, de acordo com a proposta terapêutica, conforme descrito a seguir:

Grupo 1: Seis animais que receberam, por via IP, duas aplicações da formulação HePC-PEG (correspondente a 7,5 mg/kg de miltefosina), com intervalo de 96 h entre cada aplicação.

Grupo 2: Seis animais que receberam, por via IP, duas aplicações da formulação HePC-PEG/AM (correspondente a 7,5mg/kg de miltefosina e 8,7mg/Kg de Sb), com intervalo de 96 h entre cada aplicação.

Grupo 3: Seis animais que receberam, por via IP, duas aplicações de uma mistura contendo o mesmo volume das formulações HePC-PEG (correspondente a 7,5mg/kg de miltefosina) e LAM (correspondente a 8,7mg/Kg de Sb), com intervalo de 96 h entre cada aplicação.

Grupo 4: Seis animais que receberam, por via IP, duas aplicações da formulação LAM (correspondente a 8,7mg/Kg de Sb), com intervalo de 96 h entre cada aplicação.

Grupo 5: Seis animais que receberam, por via oral, cinco aplicações de miltefosina (10mg/kg), com intervalo de 24 h entre cada aplicação.

Grupo 6: Seis animais que recebera, por via IP, cinco aplicações de AM (100mg/kg), com intervalo de 24 h entre cada aplicação.

Grupo 7: Seis animais que receberam, por via IP, solução salina estéril, a cada 24 h, durante 5 dias.

Após o tratamento os animais foram mantidos no CBEA/UFU, onde receberam água e alimentação balanceada *ad libitum*. Durante todo o experimento os parâmetros ingestão de alimento e água, comportamento, aspecto da pelagem e mucosas, além do peso dos animais foram monitorados. Dez dias após a última aplicação (dia 30) os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico.

Após a eutanásia, alíquotas de sangue total foram coletadas para avaliação da função renal e hepática, conforme descrito previamente.

Fígado e baço foram coletados e pesados, e fragmentos dos órgãos foram transferidos para tubos de microcentrífuga estéreis para a determinação da carga parasitária por PCR quantitativa (qPCR).

As extrações de DNA das amostras foram realizadas utilizando o kit “DNeasy Blood & Tissue Kit®” (Quiagen Inc., EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações da qPCR foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), em triplicata e processadas em termociclador (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, EUA). Para determinar as cargas parasitárias foram utilizados iniciadores (direto L150 [5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT(G/C)CG AA-3'] e reverso L152 [5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAACCC C-3']) que amplificam um fragmento de 120pb da região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* sp (DEGRAVE et al., 1994). As reações foram realizadas em 25µL de volume final contendo 200nM de cada iniciador, 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), e 5µL de amostra (50ng). O número de cópias de DNA de *L. infantum* em cada amostra foi determinado a partir de regressão linear, na comparação com uma curva padrão, gerada com quantidades conhecidas de DNA total de *L. infantum*.

O procedimento descrito acima foi também realizado para a amplificação de fragmento do gene TNF- α de camundongos, utilizando os iniciadores (TNF-5241 5' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA 3' e TNF-5411 5' CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC 3'), que amplificam fragmento de 170pb (CUMMINGS & TARLETON, 2003). O gene TNF- α é expresso de forma constitutiva em todas as células e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade do DNA das amostras, além de ser utilizado como normalizador das reações (BUSTIN et al., 2009).

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, de acordo com a natureza dos dados, pelos testes que mais se aplicaram a cada caso, com o auxílio dos programas de pacotes estatísticos GraphPad® InStat 5 (GraphPad Software Inc, EUA) e Origin®Pro 8.5 (OriginLab Corp., EUA).

As variáveis avaliadas neste estudo não apresentaram distribuição amostral do tipo normal, verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e, portanto, foram aplicados testes não paramétricos para identificar diferenças estatísticas entre elas.

Para calcular os valores de CI_{50} e CC_{50} , foram feitas regressões não lineares das médias dos valores encontrados para cada concentração em, pelo menos, três experimentos independentes em triplicata.

Nos ensaios de eficácia das formulações contra amastigotas intracelulares, foram procuradas diferenças entre as formulações utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's como pós-teste, para localizar diferenças estatísticas entre um grupo e outro.

No ensaio de cinética de liberação de Sb, foi realizado o teste T não pareado para localizar diferenças entre os grupos HePC-PEG/AM e LAM em cada tempo.

A análise dos parâmetros bioquímicos no teste de toxicidade foi realizada utilizando o teste de Friedman, seguido do teste de Dunn's como pós-teste, para localizar diferenças estatísticas entre os tempos.

Na análise da carga parasitária, foram procuradas diferenças entre as formulações utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's como pós-teste, para localizar diferenças estatísticas entre um grupo e outro.

Em todos os testes foi observado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

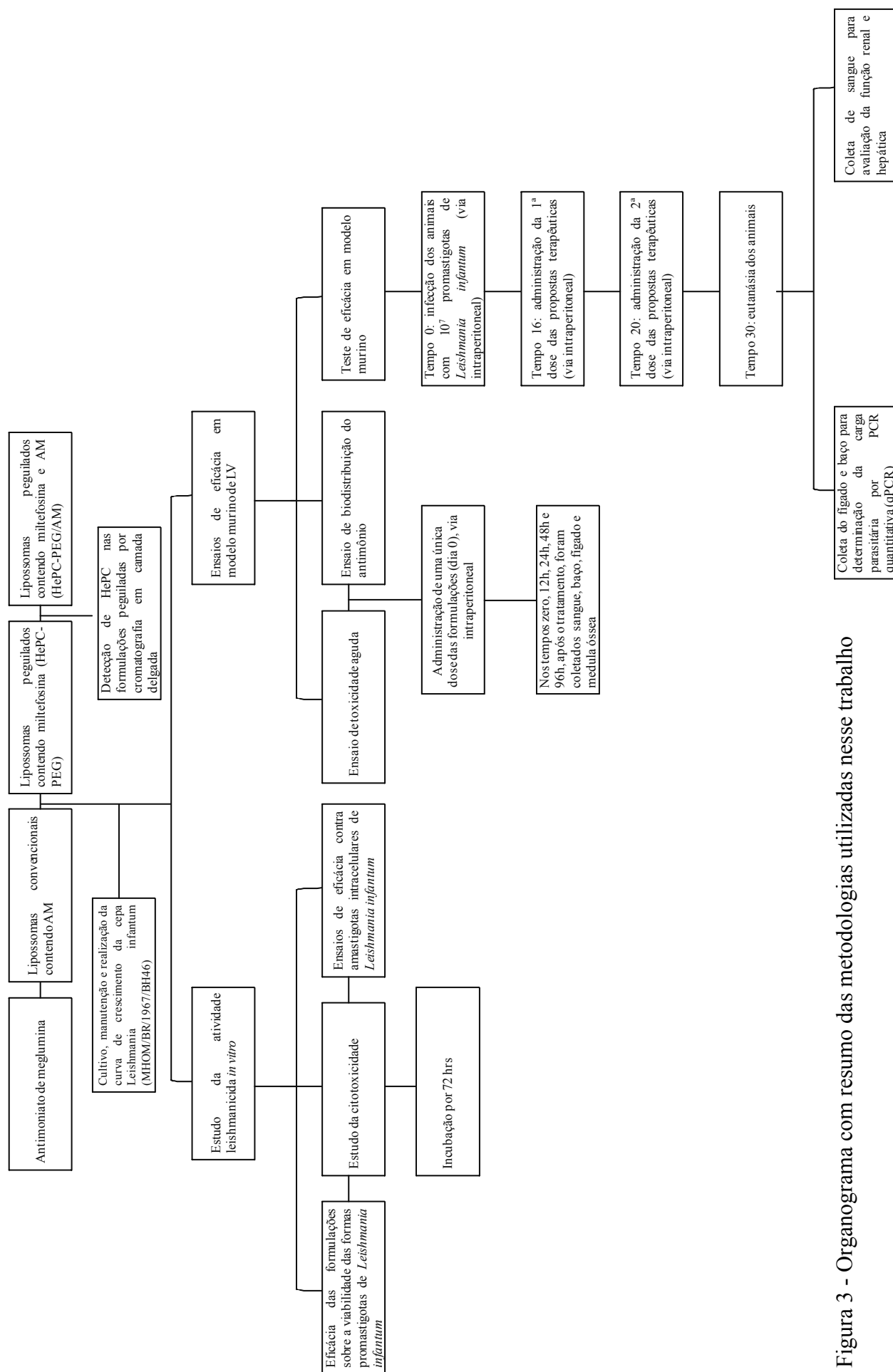


Figura 3 - Organograma com resumo das metodologias utilizadas nesse trabalho

5 Resultados

5.1 Curva de crescimento de *Leishmania infantum*

A figura 4 representa a curva de crescimento da cepa MHOM/BR/1967/BH46 em meio quimicamente definido α -MEM. As promastigotas apresentaram fase exponencial de crescimento entre o sétimo e o oitavo dia de cultura e, a partir deste iniciou-se a fase estacionária, com declínio do número de parasitos viáveis a partir do dia 15.

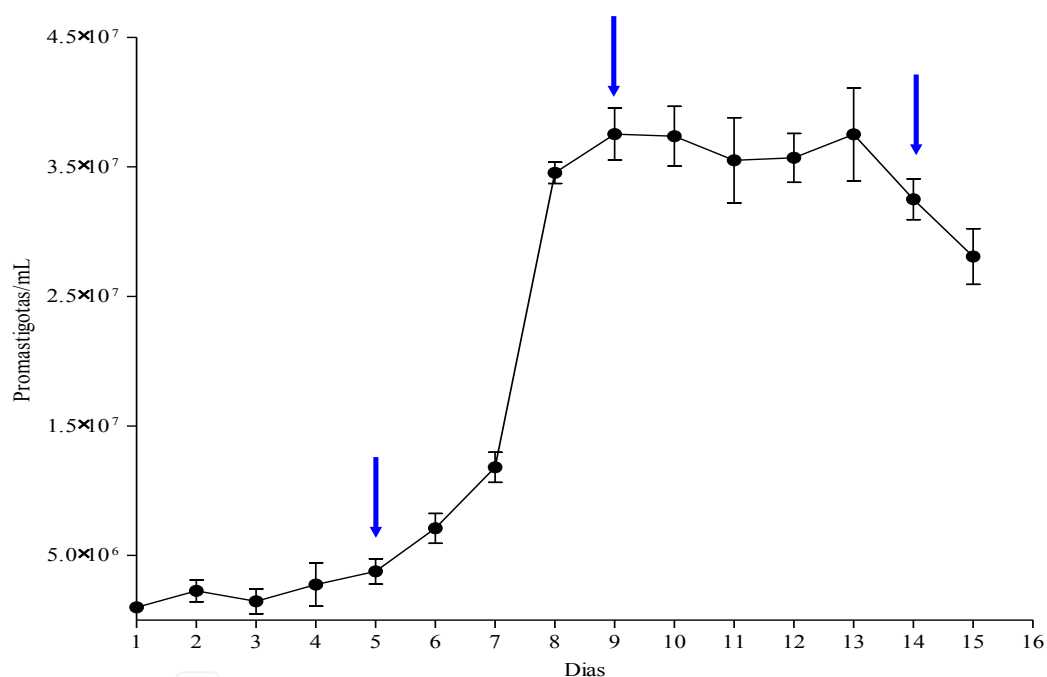


Figura 4 - Curva de crescimento de *Leishmania infantum* cepa MHOM/BR/1967/BH46 em meio de cultura quimicamente definido α -MEM. Cada ponto representa a média mais desvio padrão de três contagens diárias realizadas no mesmo horário. As setas indicam o início das fases exponencial (5º dia), estacionária inicial (9º dia) e estacionária tardia (14º dia)

5.2 Caracterização das formulações lipossomais HePC-PEG, HePC-PEG/AM e LAM

Após o preparo, as três formulações apresentaram características de sistemas nanoestruturados monodispersos, com diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas em torno de 200nm, índice de polidispersão menor que 0,3 e potencial zeta maior que $\pm 30\text{mV}$. As figuras 5 e 6 são imagens representativas da determinação destes parâmetros por espectroscopia de correlação de fótons.

O pH das formulações foi ajustado no momento do preparo das dispersões para 7,2 para o uso nos testes *in vitro* e *in vivo* e se manteve estável por pelo menos 5 dias (dados não mostrados).

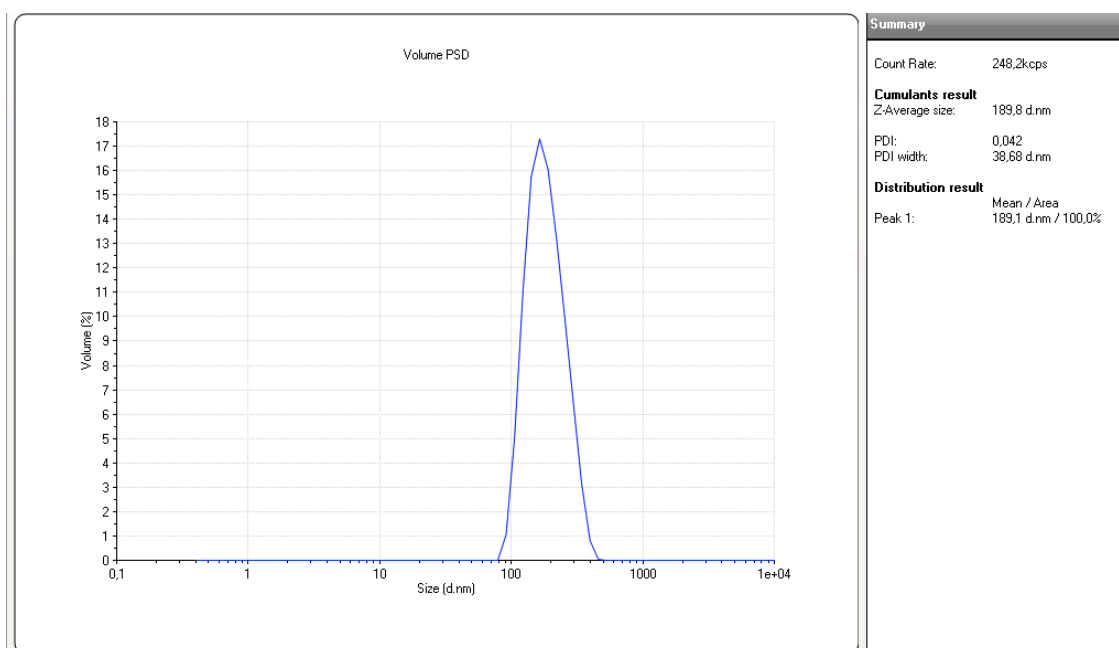


Figura 5 - Imagem representativa do diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas (*Z-average size*) e índice de polidispersão da formulação (*PDI*) de um lote da formulação lipossomal peguilada contendo miltefosina (HePC-PEG) determinado por espectroscopia de correlação de fótons.

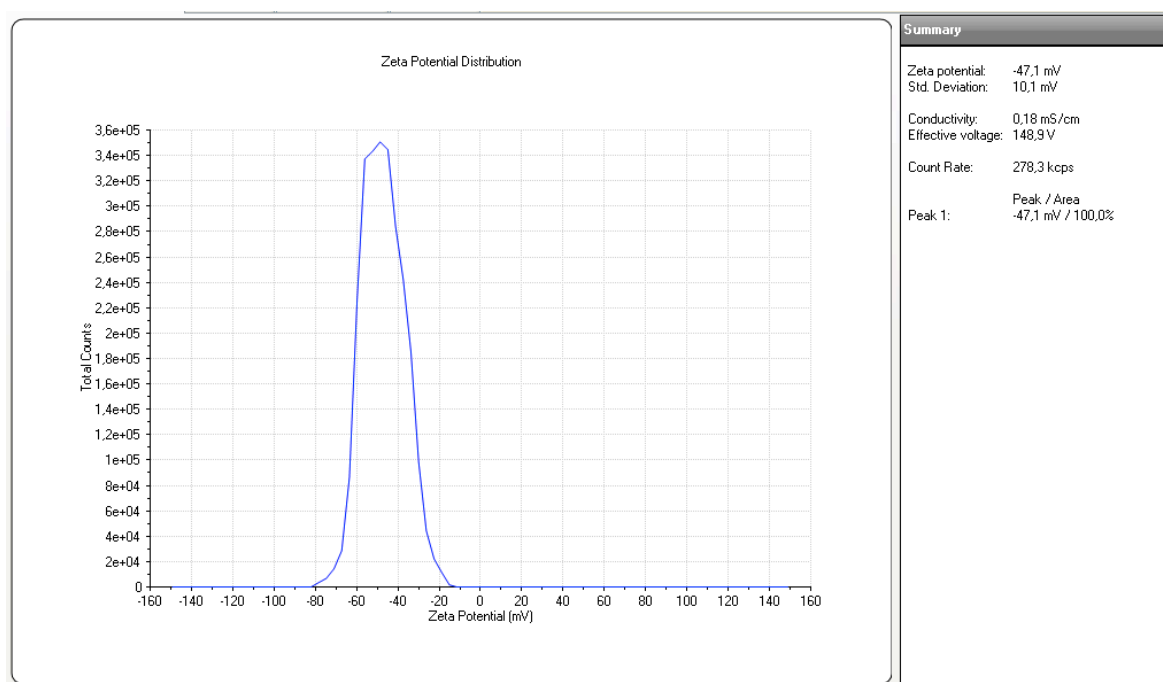


Figura 6 - Imagem representativa do potencial zeta (*Zeta potential*) de um lote da formulação lipossomal peguilada contendo miltefosina (HePC-PEG) determinado por espectroscopia de correlação de fótons.

A tabela 1 apresenta a média dos resultados obtidos no processo de caracterização de três lotes produzidos das formulações lipossomais em relação aos diferentes parâmetros, e a taxa de encapsulação de Sb no momento do uso nos testes *in vitro*.

Tabela 1 - Caracterização dos lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG), lipossomas peguilados contendo miltefosina e antimoníato de meglumina (HePC-PEG/AM), antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais (LAM)

Características*				
	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)	Taxa de encapsulação de Sb (%)
HePC-PEG	193,2 ± 6,64	0,215 ± 0,04	-60,0 ± 2,82	NA ^a
HePC-PEG/AM	200,85 ± 0,81	0,074 ± 0,083	-66,0 ± 5,7	25,0 ± 2,5
LAM	200,25 ± 0,07	0,037 ± 0,033	-48,5 ± 2,2	22,0 ± 4,4

* resultados representativos da média dos valores obtidos nas análises de três lotes produzidos de forma independente.

^a Não se aplica.

A figura 7 mostra os perfis cromatográficos em CCD das formulações peguiladas e de seus constituintes, que foram utilizados como padrão de comparação,

sendo o padrão de manchas observado para HePC-PEG e HePC-PEG/AM semelhante e constante nos ensaios realizados nos lotes produzidos, indicando a presença de todos os componentes na formulação. Além disso, não foi observada a presença de HePC livre na fase aquosa da dispersão coloidal, sugerindo que a maior parte do fármaco se manteve encapsulada, não sendo liberada das vesículas lipossomais.

Nas condições cromatográficas do ensaio, HePC e DPPC apresentaram fatores de retenção (R_f - razão entre a distância percorrida pela amostra e distância percorrida pela fase móvel) muito similar, não possibilitando sua visualização separadamente no perfil cromatográfico das formulações.

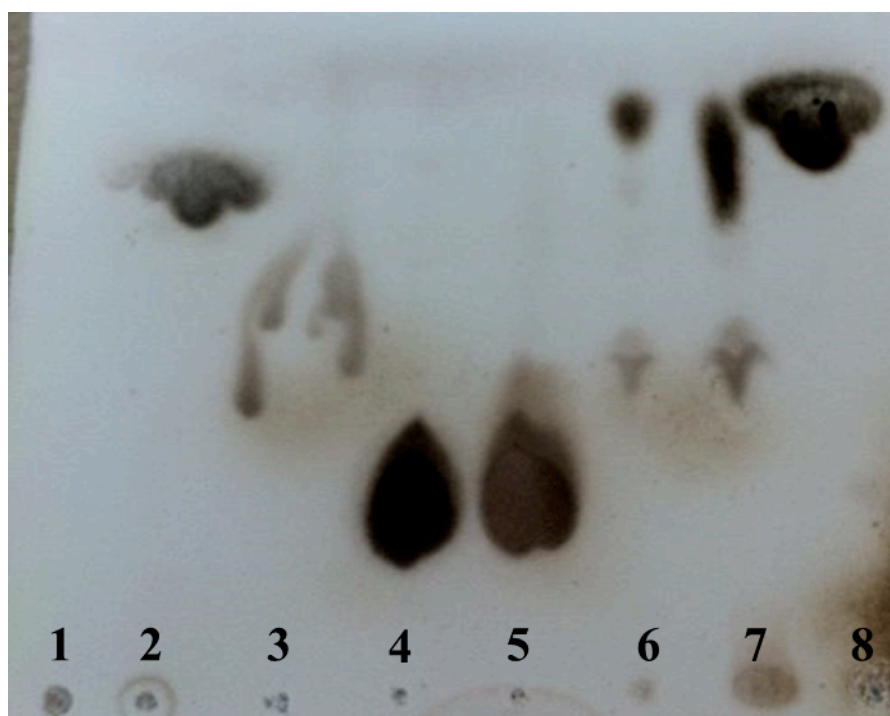


Figura 7 – Perfil cromatográfico das formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina (HePC-PEG) e miltefosina e AM (HePC-PEG/AM) e dos seus constituintes. 1) Fase aquosa da formulação de HePC-PEG; 2) DCP; 3) DSPE-PEG 2000; 4) HePC; 5) DPPC; 6) HePC-PEG; 7) HePC-PEG/AM; 8) CHOL; Fase estacionária: Sílica Gel 60; Fase móvel: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{triethylamina}/\text{H}_2\text{O}$ (30:35:34:8 v/v); Revelador: CuSO_4 (10% p/v) em H_3PO_4 (8%v/v) a 180°C .

5.3 Ensaios de eficácia das formulações HePC-PEG, HePC-PEG/AM e LAM em modelo *in vitro* de leishmaniose visceral

Um importante critério na análise de novos fármacos com ação leishmanicida é o seu potencial citotóxico para as células. Portanto, ao ser analisada a eficácia das formulações sobre o crescimento de *Leishmania* spp, também deve ser considerada a toxicidade celular, a qual foi avaliada através do método colorimétrico MTT.

A tabela 2 apresenta os valores da concentração citotóxica (CC₅₀), determinados para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c; valores da concentração inibitória (CI₅₀), definido sobre as formas promastigotas; e o índice terapêutico (IT) das formulações (razão CC₅₀/CI₅₀). Nossos dados mostram que as formulações HePC-PEG (97,73µg/mL) e HePC-PEG/AM (105,06µg/mL) apresentaram valores de CC₅₀ maiores que a LAM (79,3µg/mL), miltefosina (44,29µg/mL) e AM (75,44 µg/mL), enquanto os valores de CI₅₀ foram semelhantes para HePC-PEG (30,72µg/mL), HePC-PEG/AM (32,65µg/mL), LAM (37,05µg/mL) e para miltefosina livre (34,23 µg/mL).

O AM apresenta pouca atividade contra as formas promastigotas, sendo necessária redução para a forma mais tóxica, a trivalente (Sb³⁺), no local de ação, ou seja, no interior de macrófagos (GOODWIN & PAGE, 1943). Por esse motivo não foi determinado o CI₅₀ deste fármaco.

Tabela 2 – Valores de CC₅₀^a determinados para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, valores de CI₅₀^b determinados para formas promastigotas de *Leishmania infantum* e índice terapêutico (IT)^c após incubação por 72 horas com formulações testadas.

	CC ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	IT
Miltefosina	49,79	33,03	1,5
HePC-PEG	97,73	30,72	3,2
HePC-PEG/AM	105,06	32,65	3,2
AM	75,44	ND ^d	ND
LAM	79,3	37,05	2,14

^a CC₅₀ – concentração citotóxica capaz de gerar redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de MTT, calculada por análise de regressão não linear a partir dos dados obtidos em três ensaios independentes realizados em triplicata.

^b CI₅₀ – concentração citotóxica capaz de gerar redução de 50% no valor da fluorescência nos ensaios de rezasurina, calculada por análise de regressão não linear a partir dos dados obtidos em três ensaios independentes realizados em triplicata.

^c Razão entre CC₅₀/CI₅₀.

^d Não determinado.

Após a definição dos valores CC_{50} e CI_{50} , a eficácia *in vitro* das formulações foi avaliada em modelo de amastigotas intracelulares. As concentrações que foram utilizadas nesse ensaio foram obtidas através do índice terapêutico (IT), que é representado pela razão entre CC_{50}/CI_{50} . A partir do IT da miltefosina, usada como fármaco leishmanicida referência, que foi menor que 2, foi determinado de forma empírica, a concentração a ser utilizada baseado em um IT de 10, levando em consideração a CC_{50} definida para a miltefosina (PORTA, 2015). Baseado nisso, a concentração de miltefosina, HePC-PEG e HePC-PEG/AM utilizada nos testes foi de 10 μ M. No caso da LMA foi utilizado o mesmo volume calculado para as formulações peguiladas. Na figura 8 são apresentados os efeitos das formulações sobre os macrófagos peritoneais infectados com *L. infantum*.

HePC-PEG e HePC-PEG/AM e miltefosina apresentaram redução significativa das taxas de infecção dos macrófagos após de 72 h de exposição em relação aos grupos

ados com AM livre, LAM e ao controle ($p<0,05$).

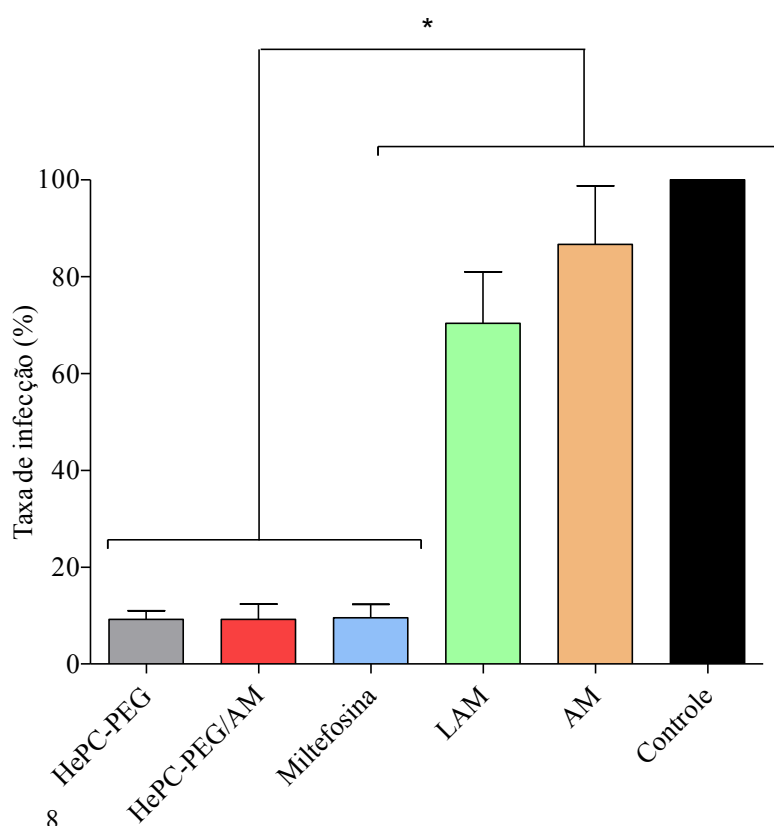


Figura 7 - Eficácia de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina (HePC-PEG) e miltefosina e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM) contra amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1967/BH46) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Macrófagos expostos a 10 μ M de miltefosina em HePC-PEG; 10 μ M de miltefosina em HePC-PEG/AM; Miltefosina livre (10 μ M); AM encapsulado em lipossomas convencionais (LMA) (16 μ g/mL de Sb); AM (40 μ g/mL de Sb). Controle: Macrófagos infectados sem exposição aos fármacos livres ou formulações; Tempo de exposição: 72h. Barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata para cada tempo. * $p<0,05$; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's

A figura 9 mostra que as formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM e miltefosina foram eficazes, promovendo redução significativa na carga parasitária dos macrófagos infectados, sem causar alterações na morfologia dessas células.

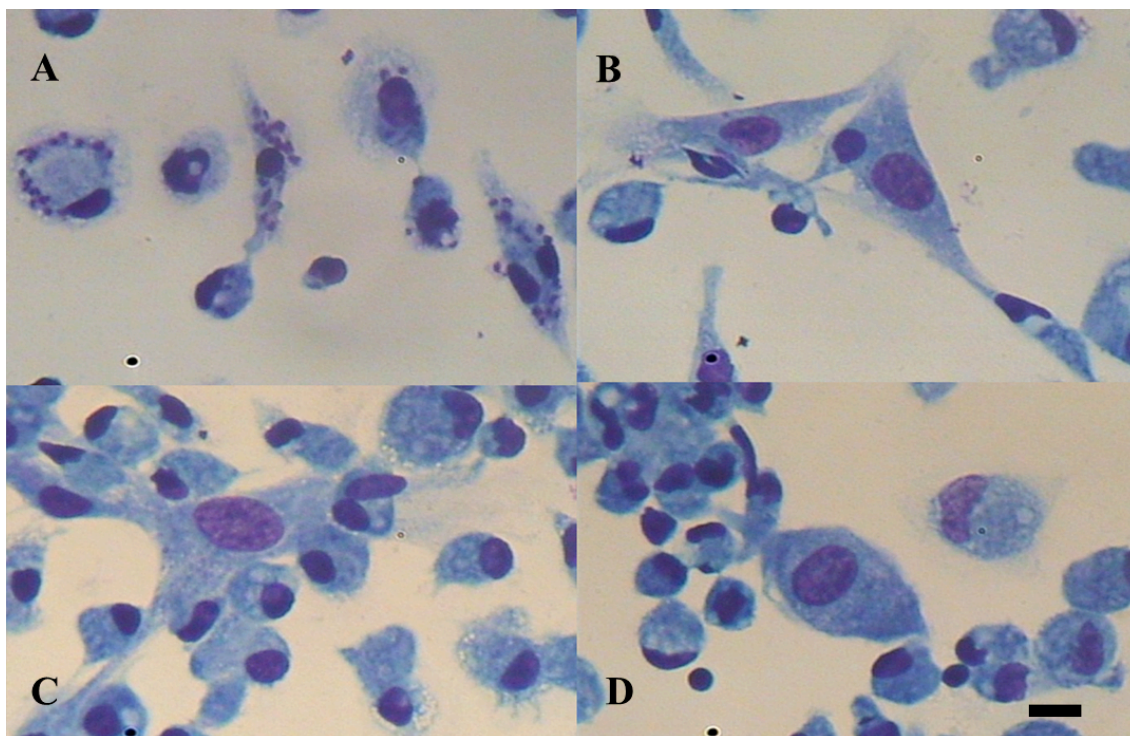


Figura 9 – Ensaio de eficácia de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimoníato de meglumina (HePC-PEG/AM) contra amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1967/BH46) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. (A) Macrófagos infectados sem exposição aos fármacos ou formulações durante 72h; (B) macrófagos infectados expostos a 10 μ M miltefosina durante 72h; (C) macrófagos infectados expostos a formulação HePC-PEG durante 72h (dose correspondente a 10 μ M de miltefosina); (D) macrófagos infectados expostos a formulação HePC-PEG/AM durante 72h (dose correspondente a 10 μ M de miltefosina e 16 μ g/ML de Sb). Figura representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Barra = 80 μ m; Aumento 1000X

5.4 Ensaios de eficácia das formulações HePC-PEG, HePC-PEG/AM e LAM em modelo murino de leishmaniose visceral

As formulações utilizadas nos ensaios *in vivo* apresentaram as seguintes características: (a) diâmetro hidrodinâmico médio de 188,5nm (HePC-PEG); 200,2nm (HePC-PEG/AM); 198,2nm (LAM); (b) IP: 0,185 (HePC-PEG); 0,133 (HePC-PEG/AM); 0,085 (LAM) e (c) $z = -62$ mV (HePC-PEG); -70 mV (HePC-PEG/AM); -52 mV (LAM).

De maneira geral as formulações foram bem toleradas pelos animais. Não foram observadas alterações no comportamento nem na ingestão de alimentos ou água, imediatamente após as administrações até o momento da eutanásia. Não houve alteração significativa no peso dos animais, que passou de 21,6g no momento da infecção (dia 0)

para 23,9g no dia da eutanásia (dia 30). Da mesma maneira, não houve diferenças significativas quando comparamos o peso médio dos animais de acordo com o grupo de tratamento e o controle.

A toxicidade de HePC-PEG e HePC-PEG/AM para camundongos BALB/c foi avaliada por meio da determinação dos parâmetros de função renal e hepática 12, 24, 48 e 96h após aplicação de dose única das formulações, em comparação com a miltefosina (figura 10). Os níveis séricos de TGO apresentaram-se acima dos valores de referência nos quatro tempos avaliados, porém com tendência a queda, para as formulações e miltefosina. Os valores variaram de 513U/L (12h) a 345U/L (96h) para miltefosina, de 446U/L (12h) a 260U/L (96h) para HePC-PEG, e 407U/L (12h) a 259U/L (96h). Os níveis de TGP estavam elevados para a miltefosina no tempo 96h (193U/L). Os demais parâmetros de função hepática e renal avaliados estavam abaixo dos valores de referência determinados.

O ensaio de biodistribuição do Sb foi realizado para as formulações HePC-PEG/AM e para a mistura HePC-PEG + LAM. A figura 11 mostra cinética (12 a 96h) da concentração do Sb no sangue e fígado dos animais após dose única destas formulações. Os níveis de Sb no sangue foram mais elevados nos camundongos que receberam a formulação HePC-PEG/AM do que nos que receberam a mistura HePC-PEG + LAM em todos os tempos avaliados. A concentração de Sb no fígado dos animais tratados com HePC-PEG/AM foi maior que a determinada para os camundongos tratados com a mistura HePC-PEG + LAM nos tempos 24h e 48h. Estes valores embora aumentados, não foram estatisticamente significativos.

De maneira geral os dados de biodistribuição dos animais tratados com HePC-PEG/AM mostram perfis semelhantes com aumento gradual das concentrações de Sb no sangue e fígado, com pico em 48h, e redução da concentração em 96h para níveis abaixo dos obtidos no tempo 24h. Por outro lado a concentração de Sb nos camundongos tratados com a formulação mista apresenta perfis diferentes para os dois órgãos. Enquanto a concentração de Sb no sangue cresce gradativamente atingindo pico em 24h e decai gradativamente até as 96h, no fígado ocorre o contrário, com a concentração aumentando de maneira gradual a partir de 24h até as 96 pós-tratamento.

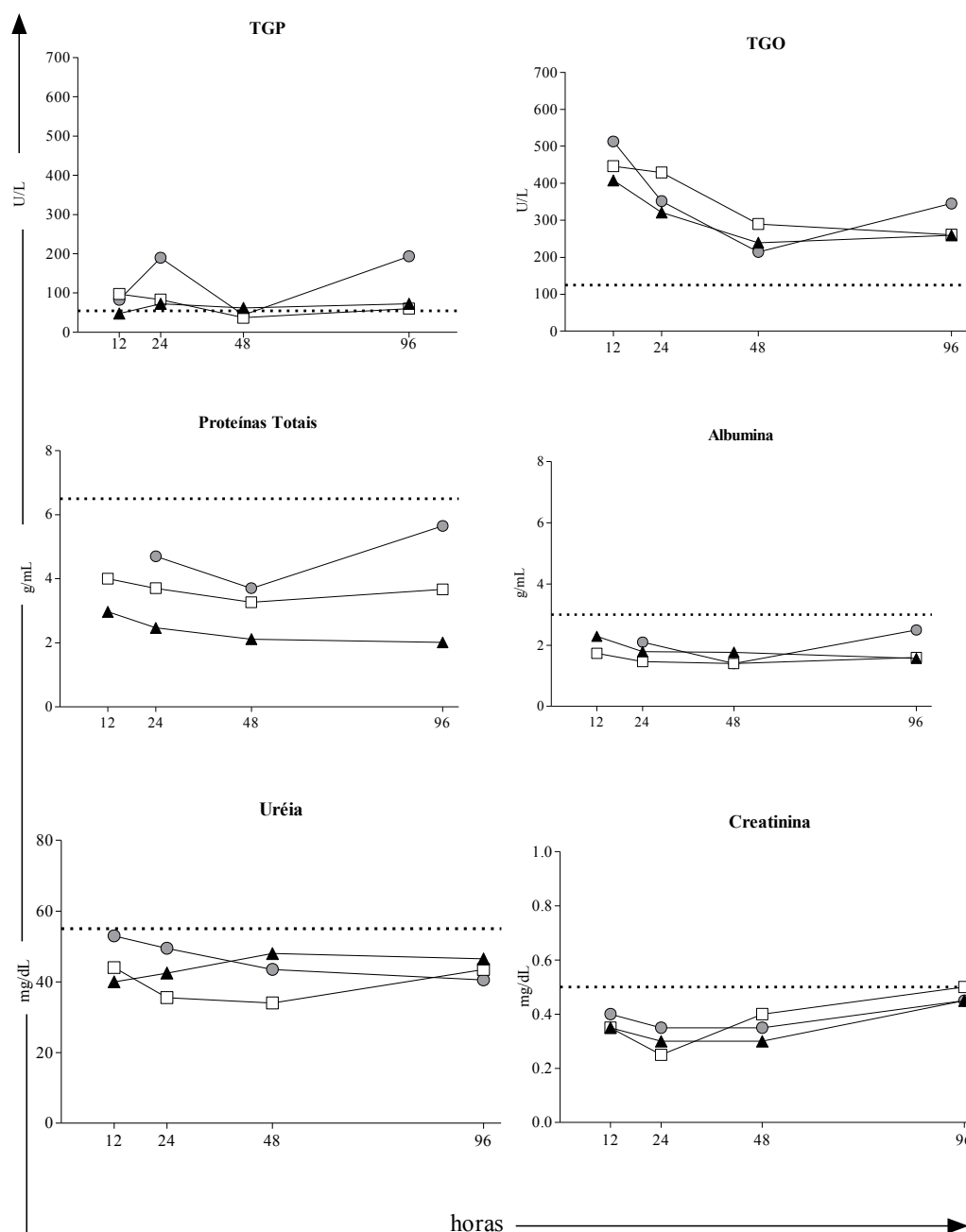


Figura 10 - Níveis séricos de transaminases pirúvica e oxalacética (TGP e TGO), proteínas totais, albuminas, ureia e creatinina determinados após administração de dose única de miltefosina e de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimonio de meglumina (HePC-PEG/AM) em camundongos BALB/c. Miltefosina - 7,5 mg/kg/via oral/dose única (círculos cinza); HePC-PEG - 7,5 mg de miltefosina/kg/ Intraperitoneal (triângulos negros); HePC-PEG/AM - 7,5 mg de miltefosina e 8,7mg de Sb/kg/Intraperitoneal (quadrados brancos). A figura representa da média de três amostras por grupo em cada tempo. (-----) Valores de referência determinado em amostras de camundongos BALB/c não tratados (n = 30)

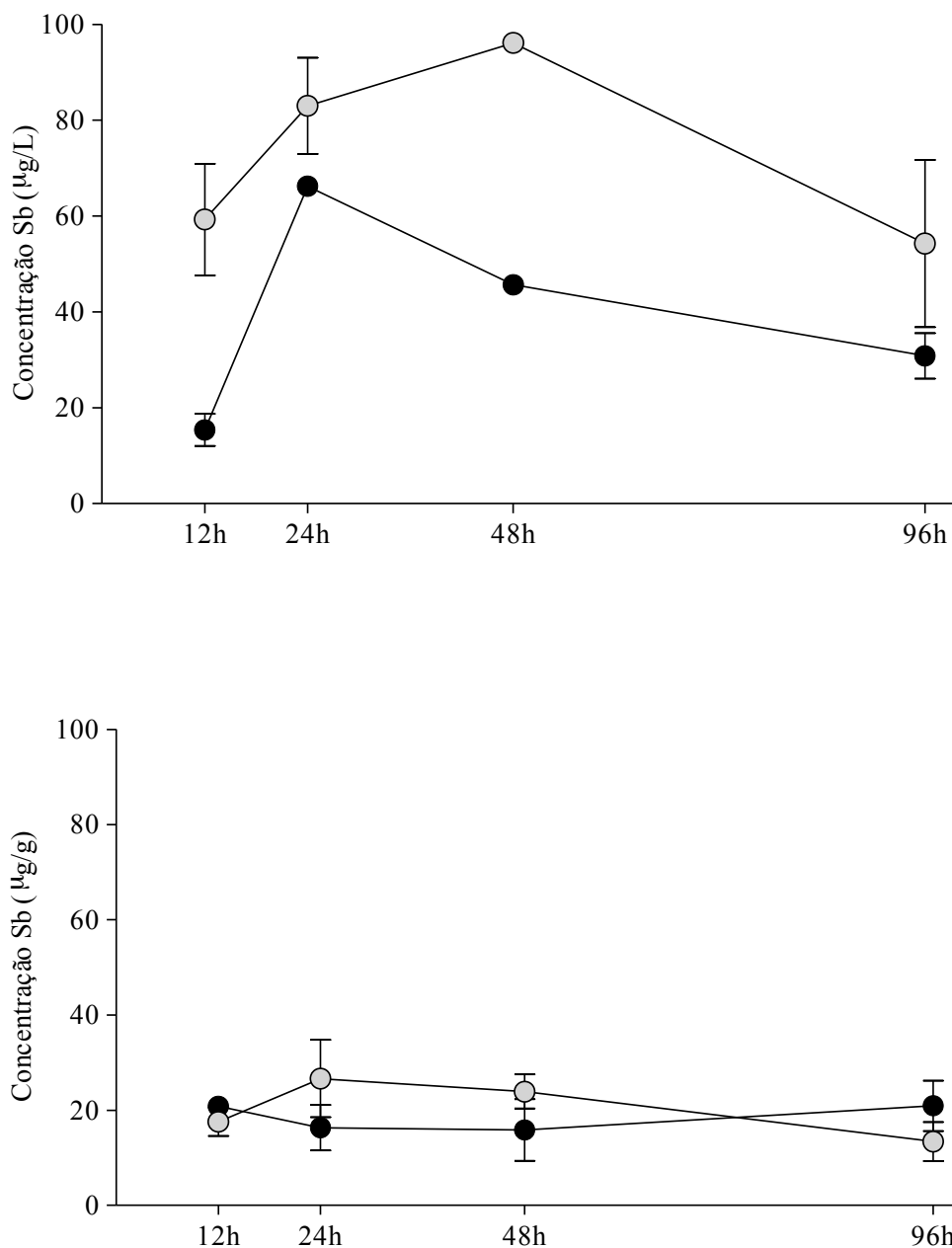


Figura 11 - Concentração de antimônio (Sb) determinada no sangue (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c após administração de dose única de formulação lipossomal de circulação prolongada contendo miltefosina e antimonioato de meglumina (HePC-PEG/AM) e da mistura composta pela formulação lipossomal de circulação prolongada contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimonioato de meglumina encapsulado em formulação lipossomal convencional (LAM). HePC-PEG/AM - 7,5 mg de miltefosina e 8,7mg de Sb/kg/Intraperitoneal (círculos cinzas); HePC-PEG + LAM - 7,5 mg de miltefosina e 8,7mg de Sb/kg/Intraperitoneal (círculos negros). Figura representativa da média mais erro padrão de três amostras por grupo em cada tempo

Dez dias após o término do tratamento foi realizada a eutanásia dos animais. Não foram observadas alterações macroscópicas dignas de nota durante a coleta dos órgãos.

A análise dos resultados de bioquímica sérica indicou que as enzimas hepáticas estavam aumentadas acima dos valores de referência para os grupos tratados. Ao contrário, os níveis séricos de ureia e creatinina estavam abaixo do valor de referência para todos, a exceção dos grupos tratados com a mistura HePC-PEG + LAM e com AM livre, que estavam discretamente aumentados. Nota-se que nos animais do grupo controle, os níveis séricos de ureia estavam também ligeiramente acima da referência (figura 12).

A figura 13 mostra o impacto terapêutico das formulações de HePC, HePC-PEG/AM, LAM e da mistura HePC-PEG + AM, e dos fármacos livres AM e miltefosina sobre a carga parasitária do fígado e baço dos animais, determinada por qCPR.

Os resultados indicam que os animais tratados com as formulações HePC-PEG/AM e com a mistura HePC-PEG + AM foram as que apresentaram melhores resultados de supressão da carga parasitária no fígado. As duas formulações lipossomais levaram a redução significativa da carga parasitária em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) e AM ($p < 0,05$). O grupo tratado com miltefosina livre apresentou carga parasitária significativamente menor que o grupo controle ($p < 0,05$).

Da mesma maneira, os animais tratados com HePC-PEG/AM ($p < 0,001$), mistura HePC-PEG + AM ($p < 0,01$) e miltefosina ($p < 0,05$) apresentaram redução significativa da carga parasitária no baço em relação ao grupo controle. Na comparação entre as formulações, HePC-PEG/AM apresentou melhores resultados, com redução significativa da carga parasitária quando comparada com os grupos controle ($p < 0,001$), HePC-PEG ($p < 0,05$), LAM ($p < 0,05$) e AM ($p < 0,01$). A figura 14 mostra o impacto do tratamento com HePC-PEG/AM sobre a carga parasitária no baço dos animais, em comparação com os grupos LAM, HePC-PEG e AM.

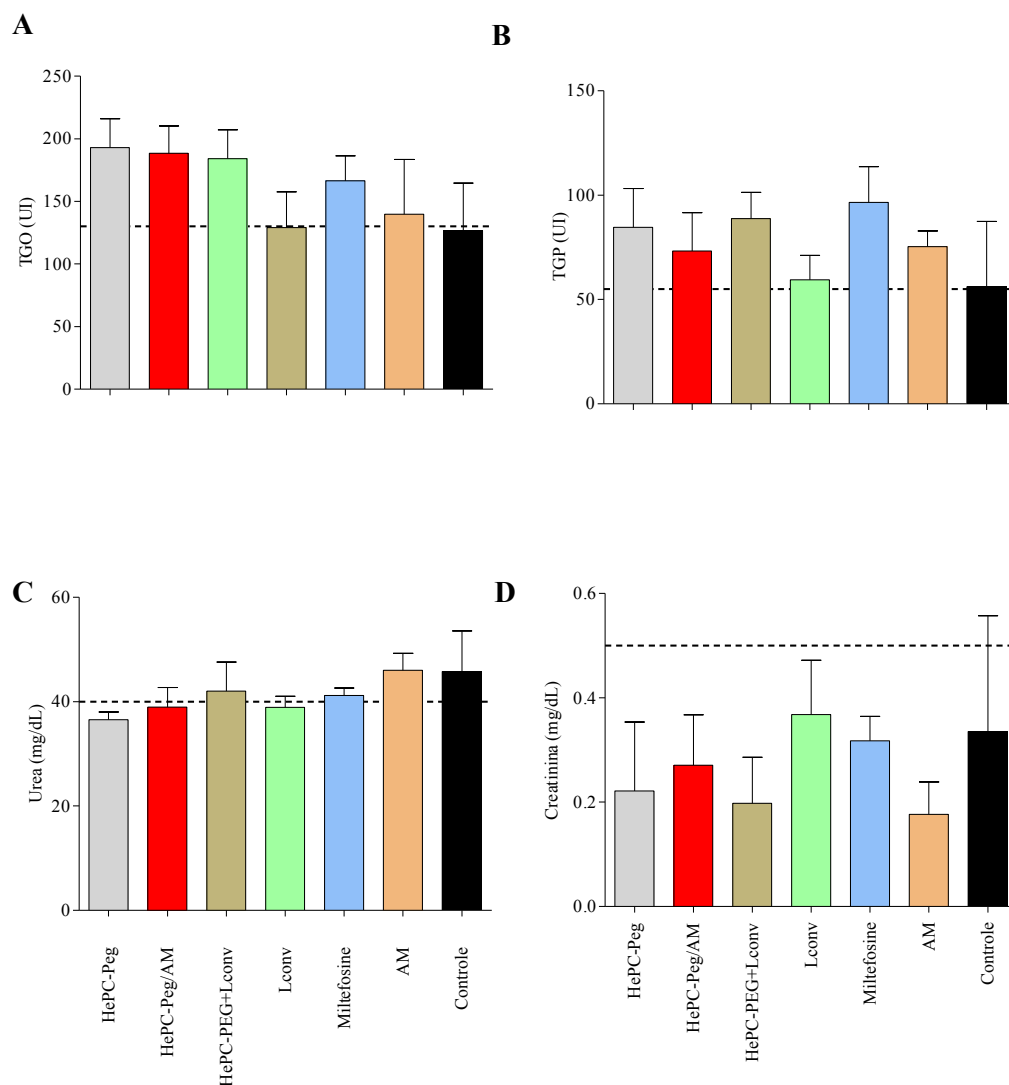


Figura 12 - Níveis séricos de transaminases oxalacética (TGO) (A) e pirúvica (TGP) (B), creatinina (C) e ureia (D) em camundongos BALB/c, dez dias após administração de formulações lipossomais de circulação prolongada HePC-PEG, HePC-PEG/AM, lipossomas convencionais LMA, mistura de HePC-PEG e LAM, antimoníato de meglumina e miltefosina. HePC-PEG - 7,5 mg de miltefosina/kg/ Intraperitoneal/96h/ duas doses; HePC-PEG/AM - 7,5 mg de miltefosina e 8,7mg de Sb/kg/Intraperitoneal/duas doses; HePC-PEG + LAM - 7,5 mg de miltefosina e 8,7mg de Sb/kg/Intraperitoneal/duas doses; Miltefosina - 7,5 mg/kg/via oral/24h/5 dias; AM - 150mg/kg Intraperitoneal/cinco doses. (-----) Valores de referência determinado em amostras de camundongos BALB/c não infectados e não tratados (n = 30)

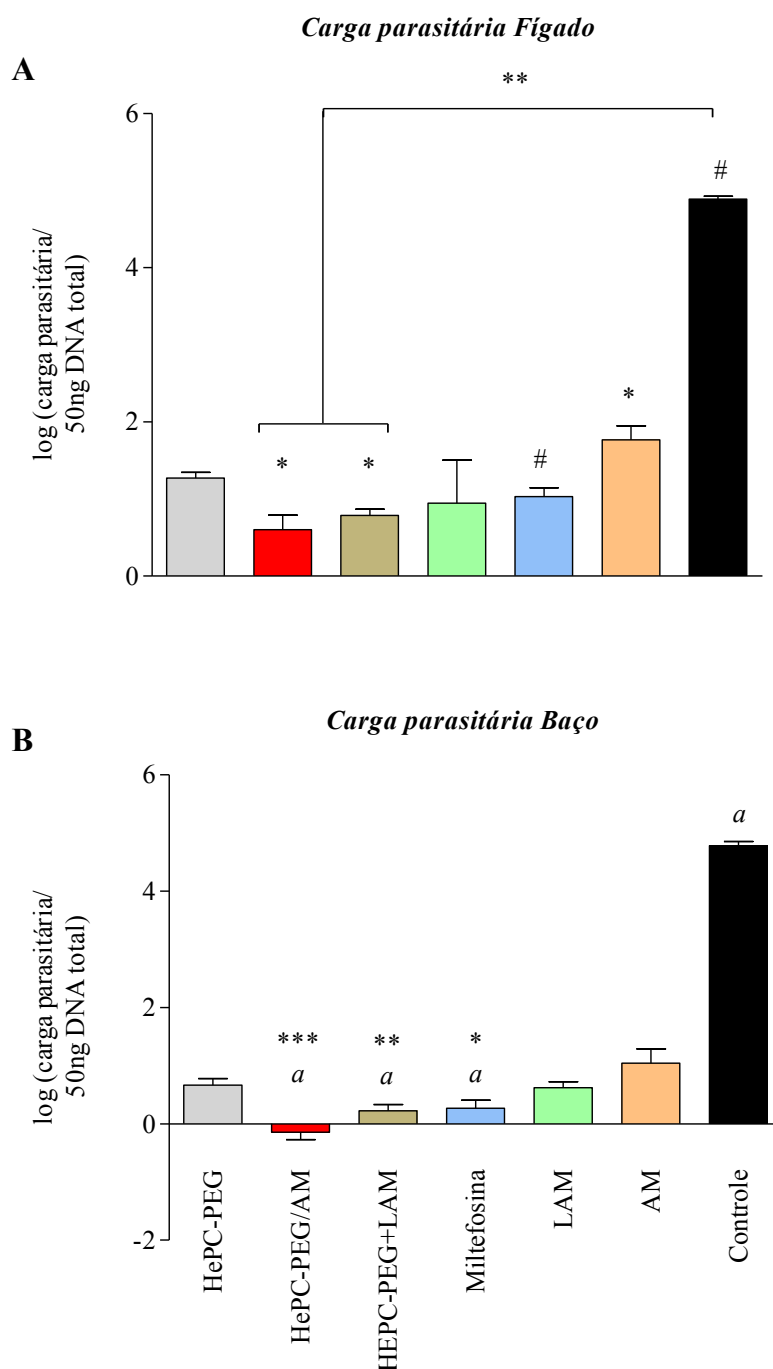


Figura 13 - Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) no fígado (A) e baço (B) de camundongos BALB/c infectados com 10^7 promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1967/BH46), dez dias após administração de formulações lipossomais de circulação prolongada HePC-PEG, HePC-PEG/AM, lipossomas convencionais LMA, mistura de HePC-PEG e LAM, antimoníato de meglumina e miltefosina. HePC-PEG - 7,5 mg de miltefosina/kg/ Intraperitoneal/96h/ duas doses; HePC-PEG/AM - 7,5 mg de miltefosina e 8,7mg de Sb/kg/Intraperitoneal/duas doses; HePC-PEG + LAM - 7,5 mg de miltefosina e 8,7mg de Sb/kg/Intraperitoneal/duas doses; Miltefosina - 7,5 mg/kg/via oral/24h/5 dias; LAM - 8,7mg/kg/Intraperitoneal/96h/duas doses; AM - 150mg (=40mg de Sb)/kg Intraperitoneal/cinco doses; Controle - solução salina estéril.

*** ($p < 0,001$); ** ($p < 0,01$); * e # ($p < 0,05$); Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn.

qPCR: $r^2 = 0,973$; slope: $-0,3225$

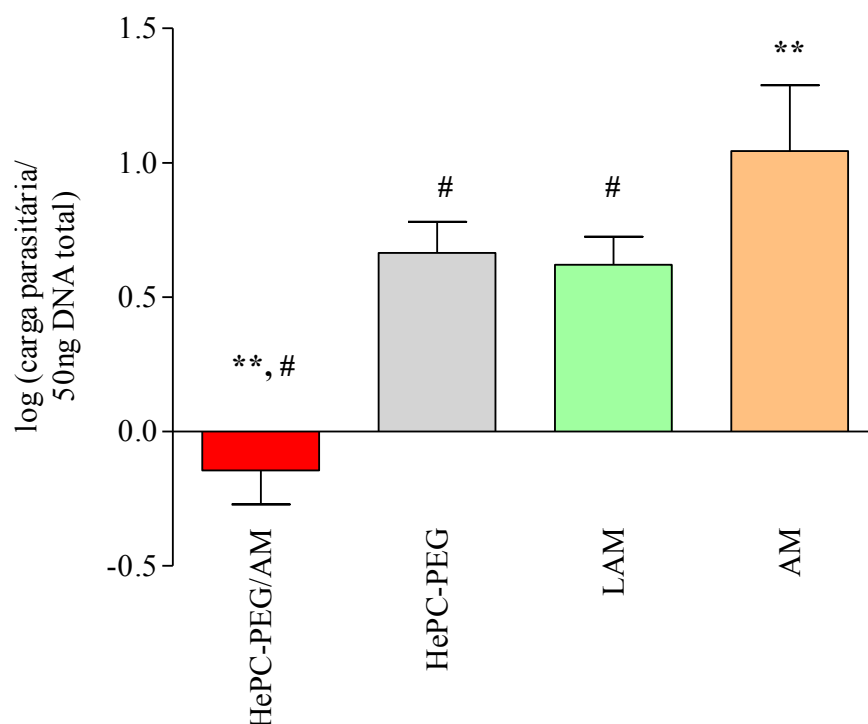


Figura 14 - Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) no baço de camundongos BALB/c infectados com 10^7 promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1967/BH46), dez dias após administração de formulações lipossomais de circulação prolongada HePC-PEG, HePC-PEG/AM, lipossomas convencionais LMA e antimoníato de meglumina. HePC-PEG - 7,5 mg de miltefosina/kg/ Intraperitoneal/96h/ duas doses; HePC-PEG/AM - 7,5 mg de miltefosina e 8,7mg de Sb/kg/Intraperitoneal/duas doses; LAM - 8,7mg/kg/Intraperitoneal/96h/duas doses; AM - 150mg (=40mg de Sb)/kg/ Intraperitoneal/cinco doses.

** (p<0,01); # (p<0,05); Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn.

qPCR: $r^2 = 0,973$; slope: -0,3225

6 Discussão

A OMS considera o controle da LV como prioridade máxima. O diagnóstico e tratamento de casos humanos, de caráter eminentemente curativo, constituem uma das principais formas de controle das leishmanioses, entretanto, os tratamentos convencionais para essas doenças ainda não têm apresentado resultados clínicos desejáveis, devido a sua baixa eficácia, toxicidade e resistência às drogas (WHO, 2010; BERMAN, 1998; PARIS et al., 2004).

Considerando os problemas relacionados ao uso da terapia convencional, a investigação de novas opções terapêuticas é extremamente importante, por isso tem sido

realizado importante esforço ao longo das últimas décadas, incentivando e financiando estudos que viabilizem avanços nas áreas de diagnóstico, controle e tratamento (WHO, 2010).

Uma nova abordagem para o tratamento das leishmanioses é combinação de drogas, que visam um regime de tratamento mais curto, mais acessível, fácil de administrar, aprimorando os efeitos da terapia individual desses medicamentos (SEIFERT, 2006).

Outra alternativa promissora seria utilizar fármacos convencionais em novos veículos e formulações. Essa técnica, chamada rejuvenescimento farmacológico, objetiva reduzir efeitos colaterais e a dose administrada, com efeito igual ou superior a terapia convencional, reduzindo a possibilidade de seleção de parasitos resistentes e proporcionando maior longevidade aos fármacos (WHO, 2010; FREZARD et al., 2012). Dentre as técnicas utilizadas para rejuvenescer fármacos está a incorporação e/ou encapsulação em lipossomas (FREZARD et al., 2012). A tendência dos lipossomas de serem capturados pelas células do SMF pode ser uma vantagem no tratamento de uma variedade de doenças infecciosas intracelulares. Esses nanocarreadores de fármacos vêm sendo estudados como uma nova estratégia para o tratamento das leishmanioses desde 1977-1978, no qual foi relatado um aumento de cerca de 700 vezes na eficácia de antimoniais pentavalentes encapsulados em lipossomas. Esse fato pode ser atribuído à captura desses lipossomas pelos órgãos (fígado, baço e medula óssea) e células (macrófagos teciduais), nas quais se localizam os parasitos causadores da doença (FREZARD et al. 2005).

Atualmente a única formulação lipossomal contendo fármaco leishmanicida (anfotericina b) aprovada para uso em humanos é o Ambisome[®]. Entretanto, o elevado custo do tratamento da LV com anfotericina b lipossomal é um fator limitante do seu uso em larga escala. Até o momento não foram comercializados nenhuma composição farmacêutica associando lipossomas com antimoniais ou outro fármaco leishmanicida. Esse fato pode estar relacionado com as dificuldades tecnológicas da obtenção de formulações lipossomais estáveis de compostos hidrossolúveis, como os antimoniais (FREZARD, 2005).

Tendo em vista a importância das leishmanioses e as dificuldades envolvidas em seus tratamentos, tais como resistência aos antimoniais, a hexadecilfosfolina ou

miltefosina desponta como uma alternativa promissora para o tratamento da LV, uma vez que pode ser administrada por via oral (SOTO, 2007). Essa droga é uma alquifosfocolina, que foi originalmente desenvolvida para o tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários. Posteriormente ela foi testada com sucesso no tratamento da LV (HILGARD, 1993; VERMAN & DEY, 2004; UNGER et al., 1989).

Na tentativa de se determinar a eficácia da miltefosina e sua ação leishmanicidas, diversos estudos vêm sendo realizados. Croft e colaboradores (1987) foram os primeiros pesquisadores que verificaram a ação leishmanicidas das alquifosfocolinas e derivados. Neste estudo, os autores investigaram a ação da miltefosina contra camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. donovani*. Posteriormente, Kuhlencord e colaboradores (1992) apresentaram uma excelente eficácia da droga em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* e *L. infantum*, tratados por via oral com o fármaco. Após quatro semanas de tratamento, os resultados obtidos através da quantificação de parasitos em macrófagos e nos órgãos, fígado, baço e medula óssea, foram superiores ao tratamento com antimônio.

A miltefosina vem sendo utilizada na Índia como terapia para os pacientes com leishmaniose refrataria ao tratamento convencional com os derivados de antimoniais pentavalentes (SINDERMANN et al., 2003), e seu uso clínico também foi aprovado contra a LV na Alemanha (2004) e Colômbia (2005) (SUNDAR et al. 2006; WHO, 2010). (SUNDAR et al.; JHA et al., 1999). Apesar das vantagens do uso da miltefosina autores sugerem expressivo aumento das taxas de insucesso terapêutico da miltefosina na Índia desde sua liberação para o uso em humanos em 2002, com aumento do número de recaídas devido ao surgimento de isolados resistentes ao fármaco (SUNDAR et al., 2012).

Até onde vai nosso conhecimento não há relatos na literatura sobre a eficácia e toxicidade, *in vivo*, de formulações lipossomais peguiladas de miltefosina contendo ou não AM. Porta (2015) preparou e caracterizou as formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM e avaliou a eficácia em testes *in vitro*, observando que as formulações apresentaram características de tamanho reduzido das vesículas, estabilidade elétrica, monodispersão, e significativa na redução das taxas de infecção de *L. infantum*.

Para este trabalho foi utilizada a cepa *L. infantum* (MHOM/BR/1967/BH46), que foi cultivada e mantida no Laboratório de Biosensaio em *Leishmania* do ICBIM/UFU, em meio quimicamente definido α -MEM, que contém ribonucleosídeos,

deoxiribonucleosídeos, sais minerais, aminoácidos, vitaminas e bicarbonato de sódio, capazes de promover a multiplicação uniforme da *L. infantum*, sem causar alterações químicas ou morfológicas no parasito (KAR et al., 1990).

A partir do cultivo foi possível construir a curva de crescimento e determinar as fases de multiplicação dos parasitos. A realização da curva de crescimento é necessária, pois existem estágios diferentes da *Leishmania* spp, sendo os mais importantes a promastigota pró-cíclica, promastigota metacíclica, e a amastigota. O desenvolvimento do parasito envolve uma fase log, onde ocorre uma maior concentração de promastigotas pró-cíclicas, uma fase estacionária, ou lag, com maior presença de promastigotas metacíclicas, e uma fase final de declínio e morte. Na fase log, o parasito está em intenso processo de reprodução, apresentando uma forma mais arredondada, porém apresenta baixa motilidade. Na fase estacionária a promastigota metacíclica se apresenta em grande número, sob a forma mais afilada e com baixa divisão, porém com maior motilidade, essa fase corresponde a fase infectante para o hospedeiro vertebrado (KILLICK-KENDRICK et al., 1974; BOGDAN, 1990; GOSSAGE et al., 2003).

Esta análise inicial do crescimento das formas promastigotas foi extremamente importante para selecionarmos o melhor momento do desenvolvimento da cepa a ser utilizada nos diferentes ensaios conduzidos neste trabalho. Para os estudos que avaliaram a atividade das formulações contra amastigotas intracelulares e para os ensaios *in vivo*, foi utilizada a cultura na fase estacionária. Para a análise da eficácia contra as promastigotas, foram utilizados parasitos em fase exponencial (log) de crescimento.

Durante o preparo das formulações HePC-PEG, HePC-PEG/AM e LAM utilizadas nesse trabalho, foram analisados parâmetro importantes em formulações lipossomais, como a distribuição de tamanho médio dos lipossomas (diâmetro hidrodinâmico médio), índice de polidispersão (utilizado para descrever a largura da distribuição de tamanho das partículas) e o potencial zeta, (determina a carga superficial das partículas) (GREGORIADIS, 2007).

As três formulações apresentaram características de sistemas nanoestruturados monodispersos, com o índice de polidispersão baixo ($<0,3$), indicando que houve uma uniformidade do tamanho das vesículas. Uma vez usado uma escala compreendida entre 0 e 1, considera-se um “bom” índice de polidispersão aquele que apresenta um valor inferior a 0,3 representando uma população de partículas com elevada homogeneidade

no diâmetro. Pelo contrário, um índice de polidispersão elevado sugere uma ampla distribuição de diâmetro mesmo a existência de várias populações (GAUMET et al., 2008).

Formulações com alto potencial zeta ($>\pm 30\text{mV}$), são considerados eletricamente estáveis, e as formulações preparadas nesse trabalho apresentaram excelente estabilidade. A alta estabilidade previne a fusão das vesículas e a perda da eficácia leishmanicida devido à formação de vesículas grandes ou micelas. O tratamento com vesículas grandes pode influenciar em sua captura pelas células do SMF e consequentemente na entrega dos fármacos nos locais de infecção, além de exacerbar os efeitos colaterais induzindo embolias e reações pseudoanafiláticas (GREGORIADIS, 2007).

As extrusões em membrana de policarbonato antes e depois da liofilização são consideradas importantes no preparo das formulações, conferindo uniformidade no tamanho hidrodinâmico das vesículas (FRÉZARD et al., 2005; AZEVEDO et al., 2014). Ambas as formulações apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio próximo a 200nm característica fundamental para garantir direcionamento eficaz aos órgãos alvo. Os tamanhos dos lipossomas influenciam na distribuição do fármaco no organismo e na eficácia da formulação em modelos murinos de LV. Em um estudo utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, Carter e colaboradores (1989) demonstraram que a redução do tamanho das vesículas, de 850 nm para 116 nm, resultou em uma maior supressão da carga parasitária no baço e medula óssea, ou seja, lipossomas convencionais de pequeno tamanho foram mais eficazes do que os lipossomas convencionais de tamanho maior.

Em relação a taxa de encapsulação de Sb, as formulações HePC-PEG/AM e LAM desse trabalho, apresentaram taxa média de 25% e 22%, respectivamente, valores semelhantes aos obtidos por Porta (2015). Nosso resultado corrobora com os dados de Frézard & Demicheli (2011), que sugeriram que a eficiência de encapsulação de Sb pode variar entre 8 a 50 %. A eficiência de encapsulação de Sb pode variar dependendo da composição da vesícula lipídica, do diâmetro do lipossoma e de acordo com o método utilizado para a preparação (MONNARD et al., 1997).

O ensaio de cromatografia em camada delgada foi realizado para verificar a presença do HePC nas formulações. As manchas observadas em ambas as formulações, HePC-PEG e HePC-PEG/AM, foi constante para todos os lotes produzidos. Não foi

evidenciada a presença de HePC livre na fase aquosa da suspensão, o que sugere que toda miltefosina foi incorporada a membrana da vesícula. Tanto HePC quanto DPPC apresentaram Rf muito semelhantes, não permitindo a visualização separadamente no perfil cromatográfico das formulações. A diferenciação entre HePC e DPPC em formulação lipossomal de circulação prolongada contendo miltefosina por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) foi tentada por Porta (2005). Da mesma maneira que ocorreu com a CCD, os perfis cromatográficos dos dois compostos foram muito semelhantes na CLAE-FR, não permitindo sua distinção. Estudos futuros utilizando espectrometria de massas devem ser conduzidos para identificar e quantificar os componentes das formulações e a concentração de HePC no plasma e tecidos de animais experimentais.

Após a caracterização dessas formulações, testamos a eficácia dos lipossomas *in vitro*. Inicialmente determinando o CC₅₀ e o CI₅₀ usando macrófagos murinos e promastigotas respectivamente, que foram expostos a diferentes concentrações das formulações preparadas nesse trabalho e aos fármacos leishmanicidas de referência (miltefosina e antimoniato de meglumina). A escolha por realizar os ensaios *in vitro* de 72h de duração foi baseada em resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa, em que não foi observado diferenças significativas nos valores de CC₅₀ e o CI₅₀ para essas formulações em ensaios de 24h, 48h e 72h (Porta, 2015). As formulações HEPC-PEG (97,73µg/mL) e HePC-PEG/AM (105,06µg/mL) apresentaram valores de CC₅₀ maiores que a miltefosina (49, 79µg/mL), indicando uma toxicidade reduzida dessas formulações. A redução da citotoxicidade dessas formulações é um resultado importante, pois permite a administração de pequenas doses sem perder a capacidade leishmanicida e reduzindo os efeitos colaterais (SILVA et al. 2012; FREZARD et al. 2012).

Porém, apesar de menor citotoxicidade, a capacidade leishmanicida das formulações não foi alterada. As formulações apresentaram CI₅₀ semelhante a miltefosina (fármaco referência), sugerindo que esta em formulação lipossomal peguilada contendo ou não AM encapsulado não apresentou redução na sua atividade leishmanicida, uma vez que os valores de CI₅₀ para estas formulações foram semelhantes ao obtido para a miltefosina livre.

Após a confirmação da baixa citotoxicidade e da atividade leishmanicida, essas formulações foram testadas contra amastigotas celulares em um ensaio de 72 h. Os resultados sugerem que as formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM foram capazes de

reduzir de forma significativa as taxas de infecção de macrófagos em relação ao controle no tempo avaliado. Além do controle, as taxas de infecção obtidas pelas formulações peguiladas e pela miltefosina livre foram significativamente menores que os obtidos pelo AM e LAM. Moraes-Teixeira e colaboradores (2011) também demonstraram a eficácia *in vitro*, da miltefosina contra macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo a *L. infantum*.

Os resultados *in vitro* obtidos nesse trabalho corroboram com estudos anteriores que mostraram que a miltefosina livre apresenta boa atividade contra formas promastigotas e amastigotas de espécies causadoras da LV (SUNDAR et al., 1998; JHA et al., 199; PARIS et al., 2004).

De maneira geral, os resultados de caracterização e eficácia *in vitro* alcançados pelas formulações peguiladas nesse estudo foram muito semelhantes aos obtidos por Porta (2005). A reprodutibilidade dos resultados sugere que a metodologia de preparo é adequada e que a miltefosina quando incorporada em formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM mantém sua eficácia terapêutica contra *L. infantum*.

A literatura, até onde vai nosso conhecimento, não apresenta estudos *in vivo* de eficácia terapêutica de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina, e miltefosina e AM, para o tratamento da LV.

Os resultados do ensaio de toxicidade aguda em modelo murino de LV indicaram que as formulações foram bem toleradas pelos animais, os quais não apresentaram alterações físicas e comportamentais durante o tratamento. Os níveis séricos de TGO apresentaram-se acima dos valores de referência nos quatros tempos avaliados, porém com tendência a queda, para as formulações e miltefosina. Os níveis de TGP estavam elevados para a miltefosina no tempo 96h. Os demais parâmetros de função hepática e renal avaliados estavam abaixo dos valores de referência determinados. Nossos resultados corroboram com Dorlo e colaboradores (2012), que sugerem toxicidade hepática aguda e transitória, onde os níveis séricos das transaminases estabilizam a partir de 24h após a aplicação da miltefosina. Após o tratamento (dia 30) os níveis das transaminases permaneceram elevados para as formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM, além da miltefosina. Estes resultados sugerem que a toxicidade hepática estaria relacionada a ação direta da miltefosina nos hepatócitos e não dos lipídeos, uma vez que os animais tratados com o fármaco livre

apresentaram níveis de transaminases semelhantes aos da miltefosina em lipossomas. Em contraponto, a dose total de miltefosina administrada nas formulações foi 15m/kg, enquanto a dose total administrada de miltefosina livre foi 42,5mg/kg. O efeito sobre as transaminases poderia ser reflexo da saturação lipídica dos hepatócitos, que levariam a patologias hepáticas (como a esteatose). Mais estudos devem ser conduzidos para determinar a presença e intensidade da hepatotoxicidade das formulações ao nível celular, especialmente os histológicos e imuno-histoquímicos.

Em contrapartida, as formulações propostas no presente estudo não causaram toxicidade nos rins dos camundongos tratados nos ensaios de toxicidade aguda e de eficácia terapêutica, enquanto que Breiser et al. (1987) observaram toxicidade significativa nesses órgãos, bem como no fígado e no pulmão, em animais tratados com miltefosina. A ausência de toxicidade renal mostrada no presente estudo parece estar diretamente relacionada ao encapsulamento do fármaco, que diminuiria os efeitos tóxicos da miltefosina nos capilares e glomérulos renais.

Os resultados do ensaio de biodistribuição do Sb, realizado para as formulações HePC-PEG/AM e para a mistura HePC-PEG + LAM, indicam que os níveis de Sb no sangue foram mais elevados nos camundongos que receberam a formulação HePC-PEG/AM quando comparado aos que receberam a mistura HePC-PEG +LAM durante a cinética de 96h. O aumento do tempo de meia vida do HePC-PEG/AM mostra que a incorporação do lipídio peguilado na membrana da vesícula lipossomal promoveu um aumento do tempo de circulação da mesma e conseqüentemente do Sb. Zagana et al. (2007) mostraram que a utilização de lipossomas peguilados é uma forma adequada para evitar a absorção rápida de lipossomas pelo fígado e baço e, assim, manter o fármaco encapsulado por mais tempo na circulação melhorando a biodisponibilidade e, como consequência, atingir os órgãos de mais difícil acesso favorecendo a ação do fármaco leishmanicida.

A concentração do Sb dos animais tratados com a mistura HePC-PEG + LAM apresentou perfil diferente no sangue e fígado. Enquanto a concentração de Sb no sangue cresce gradativamente atingindo pico em 24h e decai gradativamente até as 96h, no fígado ocorre o contrário, com a concentração aumentando de maneira gradual a partir de 24h até as 96 pós-tratamento, indicando que a encapsulação do AM em lipossomas convencionais é um fator importante para o direcionamento do Sb para o fígado. A mistura de lipossomas convencionais e peguilados resulta em uma rápida

captura das vesículas convencionais pelo fígado, permitindo que as peguiladas permaneçam por um período maior na circulação sanguínea, favorecendo o alcance dos órgãos e locais de difícil acesso (AZEVEDO et al., 2014).

A análise dos dados do qPCR em relação as formulações de interesse do estudo mostra que os animais que foram tratados com HePC-PEG/AM, e com a mistura HePC+ LAM demonstraram melhores resultados em relação à carga parasitária tanto no baço quanto no fígado quando comparados ao grupo controle. Esta melhora pode estar associada ao direcionamento do fármaco a estes órgãos devido ao modo de encapsulamento dos mesmos, assim esta ação leishmanicida se torna mais efetiva no combate ao parasito nestes órgãos que estão dentre os principais sítios de infecção (FRÉZARD et al., 2005; AZEVEDO et al., 2014). As duas formulações quando comparadas entre si apresentaram diferença de ação no baço, sendo que valores mais promissores na supressão da carga parasitária foram observados no grupo HePC-PEG/AM, sendo que no fígado a ação foi similar. Em estudo anterior foi demonstrado que o AM em uma mistura de lipossomas convencional e peguilado apresentou resultados promissores quando comparados com AM livre, e que esta mistura foi capaz de promover uma maior redução da carga parasitaria na medula óssea, baço e fígado de camundongos experimentalmente infectados quando comparado com as formulações utilizadas sozinhas (AZEVEDO et al., 2014).

A ação tanto da miltefosina quanto do AM foi observada quando comparada ao grupo controle, uma vez que as mesmas já são utilizadas comercialmente para o tratamento da leishmaniose (BURK et al., 1994; CROFT, 1986; MARSDEN, 1985; RODRIGUES et al., 1999). Frente à ação da metilfosina e do AM, as formulações HePC-PEG/AM e HePC-PEG + AM mostraram-se mais efetivas, confirmando a ação leishmanicida dos fármacos quando presentes nestes nanocarreadores. Diversos estudos têm mostrado a ação leishmanicida da miltefosina e do AM nas diferentes espécies de *Leishmania*, contudo, por apresentarem meia vida mais prolongada a toxicidade dos mesmos é aumentada e assim os efeitos colaterais podem ser maiores, contrapondo à ação menos tóxica e mais efetiva na redução da carga parasitária das formulações lipossomais (SUNDAR et al. 1998; JHA et al. 1999; MURRAY & DELPH ETIENE, 2000; PARIS et al. 2004).

De forma geral, a formulação HePC-PEG/AM apresentou maior efetividade na supressão da carga parasitária no baço quando comparada aos grupos HePC-PEG, LAM

E AM. A presença de dois fármacos leishmanicidas encapsulados em uma mesma vesícula (miltefosina e AM) poderia favorecer um efeito aditivo, ou até mesmo sinérgico entre as drogas. Esse fármaco apresenta vantagens no aspecto da eficácia do tratamento, no aspecto técnico e econômico, com diminuição de doses dos fármacos a serem administrados, reduzindo os efeitos colaterais, aumentando a qualidade de vida dos pacientes. Pois, ao invés de produzir duas drogas distintas para um tratamento mais eficaz, utiliza-se apenas uma vesícula lipossomal contendo os dois fármacos.

Nosso trabalho sugere que, por apresentar melhores resultados na supressão da carga parasitária comparado com AM e miltefosina livres, LAM e HePC, a formulação HePC-PEG/AM apresentou efeito no mínimo aditivo entre os fármacos contidos na vesícula lipossomal. Da mesma maneira, a mistura HePC-PEG + LAM também apresentou resultados promissores em relação a supressão da carga parasitária, com maior redução quando comparada com os fármacos livres e as formulações lipossomais usadas em monoterapia. Mais estudos devem ser conduzidos para confirmar e determinar o efeito sinérgico da miltefosina associada ao AM (em uma mesma vesícula ou em mistura lipossomal). Ainda, devem ser conduzidos estudos visando a otimização do preparo e adequação do protocolo terapêutico para alcançar uma melhor relação entre a supressão da carga parasitária e redução da toxicidade hepática. Como perspectivas podemos citar a redução da dose e/ou aumento do intervalo entre as aplicações, além da associação do tratamento com substâncias antioxidantes que atuam reduzindo a oxidação dos lipídeos nos hepatócitos, como as vitaminas E e C.

Dessa forma, acreditamos que pela primeira vez foi realizada a prova de conceito que formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina e AM foram eficazes para o tratamento da LV e a mistura de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina e convencionais contendo AM, *in vitro* e *in vivo*, apresentando redução significativa do número de parasitos no fígado e baço, que são órgãos que apresentam altas densidades de *L. infantum*. Acreditamos que nossos resultados fornecerão subsídios para propor testes pré-clínicos dessas formulações em outros modelos de LV, como hamsters cães e primatas não-humanos, e abre uma nova perspectiva terapêutica para a LV, baseada em inovador sistema de entrega de fármacos leishmanicidas, capaz de rejuvenescer fármacos convencionalmente usados na terapia da doença.

7 Conclusões

- As formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina (HePC-PEG), contendo miltefosina e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM) e convencional contendo antimoniato de meglumina apresentaram estabilidade elétrica, monodispersão e diâmetro hidrodinâmico médio inferior a 200nm.
- HePC-PEG e HePC-PEG/AM apresentaram valores de CI_{50} semelhantes e CC_{50} maiores do que o obtido para miltefosina livre. As formulações apresentaram, ainda, redução significativa das taxas de infecção dos macrófagos por *Leishmania infantum*, em relação aos grupos controle, e aos animais tratados com antimoniato de meglumina e LAM.
- Os parâmetros de função renal não foram alterados com o tratamento. Os níveis séricos enzimas indicadoras de função hepática apresentaram-se acima dos valores de referência, após o tratamento.
- A concentração de antimônio (Sb) no sangue dos animais tratados com HePC-PEG/AM foi maior do que os que receberam a mistura HePC-PEG + LAM, 96h após aplicação de dose única das formulações.
- A concentração de Sb no fígado dos animais tratados com a mistura HePC-PEG + LAM foi maior que a determinada para os camundongos tratados com HePC-PEG/AM, 96h após aplicação de dose única das formulações.
- HePC-PEG/AM, HePC-PEG + AM apresentaram redução significativa na carga parasitária do fígado em camundongos infectados com *Leishmania infantum* após duas aplicações com intervalo de 96h entre cada uma, em relação aos grupos tratados com antimoniato de meglumina livre e ao controle.
- HePC-PEG + AM apresentou redução significativa na carga parasitária no baço de camundongos infectados com *Leishmania infantum* após aplicação de duas doses em relação ao grupo controle.
- HePC-PEG/AM apresentou redução significativa na carga parasitária no baço de camundongos infectados com *Leishmania infantum* após aplicação de duas doses em relação aos grupos HePC-PEG, LAM e AM e controle.

8 Referências Bibliográficas

- ALLEN, T. M.; HANSEN, C. B.; LOPES DE MENESES, D. E. Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p. 267-284, 1995.
- ALVAR, J., YACTAYO, S., BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitology**, v. 22, p. 552-557, 2006.
- ARTAN, R., YILMAZ, A., AKÇAM, M., AKSOY, N.H. Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal Gastroenterology Hepatology**, v. 21, (1Pt 2) p. 299-302, 2006.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinical Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.
- AZEVEDO, E. G. **Lipossomas de circulação prolongada contendo antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral. 2013. Tese (Doutorado) em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.**
- 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. P.; REZENDE, S. A.; FRÉZARD, F. Use of a mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 10, p. 1551-1560, 2014.
- BALANA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIA, J. C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, p. 435-443, 1998.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BATES, P.A. *Leishmania* and fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, p. 340-344, 2008.
- BATISTA, L. L.; SOBRINHO, J. A.; BARROS, A. A. P.; NUNES, J. C.; ALMEIDA, W. L. A Leishmaniose Visceral como doença oportunista em um geronte portador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). **Revista APS**, v.7, n.2, p.119-124, 2004.
- BERMAN, J. Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 11, n.6, p. 707-10, 1998.
- BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.
- BODGAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. **Parasitology Today**, v. 6, n. 6, p. 183-1187, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: DF, 2005. s/p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: DF, 2006. s/p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: DF, 2006. s/p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: DF, 2007.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

_____. Ministério da Saúde. **Guia de bolso: Doenças infecciosas e parasitárias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

_____. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para a redução da letalidade**. Editora do Ministério da Saúde. 1ed. Brasília, 2011.

BRETAGNE, S.; DURAND R.; OLIVI, M.; GARIN, J. F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 828–831, 2001.

BRUSTOLOLONY, Y. M. **Leishmaniose Visceral em crianças no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**: Contribuição ao diagnóstico e ao tratamento. 2006. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Rede Centro-Oeste UnB/UFG/UFMS, Campo Grande, 2006.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; KATZ, G.; RODAS, L. A. C.; POLETTTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPÍNOLA, R. M. F.; CRUZ, O. G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1263-1267, 2001.

CAMPOS, J. F. F. **Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosina em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) brasiliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental.** 2008. Dissertação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

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? **Natures review/microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CORRAL, M.J, GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, E., CUQUERELLA, M., ALUNDA, J.M. Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. **Journal Microbiology Methods**, v. 94, n. 2, p.111-6, 2013.

COSTANTINI, S.; GIORDANO, R.; RIZZICA, MM.; BENEDETTI, F. Applicability of anodic-stripping voltammetry and graphite furnace atomic absorption spectrometry to the determination of antimony in biological matrices: a comparative study. **Analyst**, v. 110, p. 1355-1359, 1985.

COURA, J. R. Identificação de *Leishmania*. **In:** Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 733-738, 2005.

CROFT, S.L. In vitro screens in the experimental chemotherapy of Leishmaniasis and trypanosomiasis. **Parasitol Today**, v. 2, p. 64-9, 1986.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, p. 53-59, 2003.

DA SILVA, S. M.; AMORIM, I. F.; RIBEIRO, R. R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELLI, C.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N. DE F.; MICHALICK, M. S.; FREZARD, F. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated MeglumineAntimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 2858-67, 2012.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n.3, p. 463-9, 1994.

DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; SILVA, LULA, I.; GOZZO, F. C.; EBERLIN, M. N.; FREZARD, F. Pentavalent organo antimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumina antimonate. **App Organ Chem**, v. 17, p. 226-231. 197, 2003.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

DORLO, T. P. C.; HILLEBRAND, M. J. X.; ROSING, H. Development and validation of a quantitative assay for the measurement of miltefosine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal Chromatography B Analytical Technologies and Biomedical and Life Sciences**, v. 865, p. 55–62, 2008.

ESLAM, I. Z.; TANNER, C. E. Time course and intensity of infection in vitro in the resident peritoneal macrophages of resistant and susceptible mice exposed to different doses of *Leishmania donovani* promastigotes. **International Journal of Parasitology**, v. 24, p. 743-747, 1994.

FILHO, A. V. C.; LUCAS, I. C.; RIBEIRO SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimonialato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, n.4, p. 424-427, 2008.

FILIPPIN, F. B., SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Santa Catarina (SC), v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Química Nova**, v. 28, p.511-518, 2005.

FRÉZARD, F.; AZEVEDO, E. G.; RIBEIRO, R. R.; SILVA, S. M.; DEMICHELI, C.; RESENDE, S. Composição farmacêutica contendo lipossomas convencionais e lipossomas de circulação prolongada para o tratamento da leishmaniose visceral. Pedido de depósito de patente no INPI BR20120052652, 09 de março de 2012.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 1– 9, 2008.

GONÇALVES, R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; RASO, P.; TAFURI, W. L. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 3, p. 153-158, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36(1), p.71-80, 2003.

GOODWIN, L.G., PAGE, J.E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem Journal**, v.37, n.2, p.198-209, 1943.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate grow phases during the development of *Leishmania* in sand flies? Implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, n.3, p. 1027-1034, 2003.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal of Parasitology**, v. 35, p.1169-1180, 2005.

GREGORIADIS, G. Liposome technology - Liposome Preparation and Related Techniques, **Ed. Informa Healthcare USA, Inc.**, 3a ed., v. 1, 324 p. 2007

GRIENSVEN, J. V.; BALASEGARAM, M.; MEHEUS, F.; ALVAR, J.; LYNEN, L.; BOELAERT, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis, **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, p. 184–194, 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 proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 494-501, 2002.

GUSMÃO, J. D.; BRITO, P. A.; LEITE, M. T. S. Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no norte de minas gerais, Brasil, no período de 2007 a 201. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 615-624, 2014.

HILGARD, P.; KLENNER, T.; STEKAR, J.; UNGER, C. Alkylphosphocholines: a new class of membrane active anticancer agents. **Cancer chemotherapy and Pharmacology**, v. 32, p. 90-95, 1993.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; TAKUR, C. P. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 24, p. 1795-18000, 1999.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LAINSON R & SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. **In:** Petters & Killick-Dendrick. The leishmaniasis in biology and medicine. **Academic Press**, v. 1, p. 1-20. 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. **In:** Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases. London: Arnold, v. 5, p.241-66. 1998.

LAINSON, R.; SHAW J. J. New World Leishmaniasis. **In** Cox FEG, Wakelin D., Gillespie SH, Despommier DD. Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Parasitology, 10 th ed., ASM Press, London, p. 313-349, 2005.

LEISHMANIOSE Visceral no Brasil. 2005, **FUNASA, Boletim eletrônico epidemiológico**. Disponível em www.funasa.gov.br. Acessado em: 14 de junho de 2014.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 2, p. 80-82, 1997.

LUZ, Z. M. P.; PIMENTA, D. N.; CABRAL, A. L.; FIÚZA, V. O.; RABELLO, A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 249-254, 2001.

KAR, K.; MUKERJI, K.; NASKAR, K.; BHATTACHARYA, A.; GHOSH, D. K. *Leishmania donovani*: a chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to to promastigotes. **Journal Protozoology**, v.37, n. 4, p. 277-9, 1990.

KAUFMANN-KOLLE, P.; DREVS, J.; BERGER, M. R.; KÖTTING, J.; MARSCHNER, N.; UNGER, C.; EIBL, H. Pharmacokinetic behavior and antineoplastic activity of liposomal hexadecylphosphocholine. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.34, n. 5, p. 393-8, 1994 .

KLIBANOV, A. L.; MARUYAMA, K.; TORCHILIN, V. P.; HUANG, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. **FEBS Lett**, v. 268, n. 1 ,p. 235-7, 1998.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H; ASHFORD, R. W.; Ultrastructural observations on attachment of *Leishmania* in the sandfly. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 269, 1974.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, p. 1–24, 1990.

LE FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIEVRE, A.; GROUSSON, D.; KUBAR, J. Short-and long- term efficacy os hexadecylphosphocolina against established *Leishmania infantum* infection in Balb/c mice. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 42, p. 654-658, 1998.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.12, p. 2941-2947, 2008.

KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 8, p.1630-4, 1992.

MANNA, L. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 271-280, 2006.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drug for new diseases. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 18, p. 187-198, 1985.

MAURICIO, I. L., GAUNT, M. W., STOTHARD, J. R., MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v. 122, p. 393-403, 2001.

MEYERHOFF, A. U. S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 42-48, 1998.

MEYERHOFF, A. U. S. food and drug administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 42-48, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015- Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acessado em: 10 de fev. de 2016.

MIRANDA, J. C.; DIAS, E. S. Vetores das leishmanioses nas Américas. **In:** Barral A, Costa J. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas, p. 55-64, 2011.

MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A.; MACIEL, G. B.; MICHALSKY, E. M.; DIAS, E. S. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 76-78, 2011.

MONTEIRO, O. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS J. R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 67-72, 1994.

MORE, B.; BHATT, H.; KUKREJA, V.; AINAPURE, S. S. Miltefosine: great expectations against visceral leishmaniasis. **Journal Postgrad Medicine**, v. 49, p. 101-103, 2003.

MU, Y.; ZHOU, H.; LI, W.; HU, L.; ZANG, Y. Evaluation of RNA quality in fixed and unembedded mouse embryos by different methods. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 95, n. 2, p. 206-12, 2013.

MURRAY, H. M. & DELPH-ETIENNE, S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecyphosphocoline (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanism. **Journal infectious Diseases**, v. 181, p. 795-799, 2000.

NASCIMENTO, M. D. S. B.; SOUZA, E. C.; SILVA, L. M.; LEAL, P. C.; CANTANHEDE, K. L.; BESERRA, G. F. B.; VIANA, G. M. C. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1801-1807, 2005.

OLIVA, A. et al. Incidence and time course of *Leishmania* infections detected by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1318-1322, 2006.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas . **In:** Report Leishmaniasis, n.1, 2013.

PARIS, C. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 3, p. 852-9, 2004.

PAPAGIANNAROS, A., BORIES, C., DEMETZOS, C., LOISEAU, P.M. Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. **Biomed Pharmacother**, v. 59, n.10, p. 545-50, 2005.

PAULA, M. B. C.; RODRIGUES, E. A. S.; SOUZA, A. A.; REIS, A. A.; PAULA, F. P.; PAUJUABA, A. A.; LIMONGI, J. E. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Uberlândia, MG, concomitante com o relato de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 304-305, 2008.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PETERS, N. C. ; EGEN, J. G. ; SECUNDINO, N. ; DEBRABANT, A. ; KIMBLIN, N. ; KAMHAWI, S. ; LAWYER, P. ; FAY, M. P. ; GERMAIN, R. N. ; SACKS, D. In vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n.5891, p. 970-4, 2008.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: TERMIGNONI, C.; MASUDA, H.; NETO, M.; SILVA, A. C. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012. Disponível em: <file:///C:/Users/Eder/Downloads/Capitulo%2012%20A%20Interacao%20do%20Protozoario%20Leishmania%20com%20seus%20Insetos%20Vetores%20(1).pdf>. Acessado em: 21 de janeiro de 2016.

PHAM, T. T. H.; BARATT, G.; MICHEL, J. P; LOISEAU, P. M; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B–miltefosine-loaded nanocochleates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p.224– 233, 2013.

PIMENTA, P. F., TURCO, S. J., MCCONVILLE, M. J., LAWYER, P. G., PERKINS, P. V., SACKS, D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, v.256, n. 5065, p. 1812-1815, 1992.

PORTA, M. R. **Preparo, caracterização e eficácia *in vitro* de formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina e antimonato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral**. 2015. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas)-Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Uberlândia-MG.

PRASAR, R.; KUMAR, R.; JAISWAL, B. P.; SINGH, U. K. Miltefosine: na oral drug for visceral leishmaniasis. **Indian journal of pediatrics**, v. 71, p. 143-144, 2004.

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

REUS, M.; GARCÍA, B.; VÁZQUEZ, V.; MORALES, D.; FUSTER, M.; SOLA, J. Visceral leishmaniasis: diagnosis by ultrasound-guided fine needle aspiration of an axillary node. **British Journal Radiology**, v.78, p. 158-160, 2005.

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

RODRIGUES, M. L. O.; COSTA, R. S.; SOUZA, C. S.; FOSS, N. T.; ROSELINO, A. M. F. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 41, p. 33-37, 1999

ROSAS FILHO, M. S.; SILVEIRA, F. T. Epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de Leishmaniose Visceral no Pará. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21 n. 3, p 7-18, 2007.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in leishmaniasis. **The Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunol**, v. 3, p. 1041-1047, 2002.

SALIBA, E. K.; OUMEISH, Y. O. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. **Clinical Dermatology**, v. 17, p.275-277, 1999.

SCHETTINI, D. A.; RIBEIRO, R. R.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O. G.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; FREZARD, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **The International Journal of Pharmaceutics**, v. 315, p. 140-147, 2006.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, p. 255-257, 1993.

SECUNDINO, N. F. C.; FREITAS, V. C.; PIMENTA, P. F. P. A Biologia da interação dos flebotomíneos com a *Leishmania*. In: Barral A, Costa J. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas* p. 90-101, 2011.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosina and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73-9, 2006.

SENA, J. M.; CAMARGO-NEVES, V. L. F.; ALVES, W. A.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Avaliação do controle químico aplicado nas áreas de ocorrência da leishmaniose visceral, Brasil, 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, 2007.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 5, p. 577-9, 2006.

SILVA, S. M.; AMORIM, I. F.; RIBEIRO, R. R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELLI, C.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S.; FREZARD, F. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 2858-2867, 2012.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SINDERMANN, H.; CROFT, L.; ENGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido®): the first oral treatment against leishmaniasis. *Medical Microbiology Immunology*, v. 193, p. 173-180, 2004.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection Chemotherapy*, v. 10, p. 307-315, 2004.

SIMPSON, L. Kinetoplast DNA in tripanosomid flagellates. *International Review Cytology*, v. 99, p. 119-207, 1986.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Dados de Ocorrência de Infecção Hospitalar, da Mortalidade por Causas Externas e da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 2004. p. 141-144.

SOARES, M.J.V., MORAES, J. R. E., BORGES, V. P., MIYAZATO, L.G., MORAES, F.R. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. *Journal of Venomous Animals and Toxics including diases*, v. 11, n.4, p.579-593, 2005.

SOTO, J.; TOLEDO, J.T. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, v. 7, p. 7-7, 2007.

SONODA, M. C. **Leishmaniose visceral canina**: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

STAUBER, L. Leishmaniasis in the hamster. In "Some Physiological Aspects and Consequences of Parasitism," (W. H. Cole, ed.), Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey, p.76–90, 1955.

SUNDAR, S.; ROSENKAIMER, F.; MAKHARIA, M. K.; GOYAL, A. K.; MANDAL, A. K.; VOSS, A.; HILGARD, P.; MURRAY, H.W. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. **Lancet**, v. 352, n.9143, p.1821-3, 1998.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V. W.; SINGH, A. K.; OSTVN, B.; BOALAERT, M.; DUJARDIN, J. C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p. 543–550, 2012.

UNGER, C.; DAMENZ, W.; FLEER, E. A.; KIM, D. J.; BRUISER, A.; HILIGARD, P.; ENGEL, J.; NAGEL, G.; EIBI, H. Hexadecylphosphocoline, a new ether-lipid analog. Studies on antineoplastic activity in vitro and in vivo. **Acta Oncologica**, v. 28, p. 213-217, 1989.

VALLADARES, J. E.; RIERA, C.; GONZALEZ-ENSENYAT, P.; DIEZ-CASCON, A.; RAMOS, G.; SOLANO-GALLEGU, L.; GALLEGU, M.; PORTUS, M.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 15-21, 2001.

VERMAN, N. K. & DEY, C. S. Possibli mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 48, p. 3010-3015, 2004.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**. v. 38, p. 147-160, 2005.

TASWELL C. Limiting dilution assay for the determination of immunocompetent cell frequencies III. Validity tests for the single-hit Poisson model. **J. Immunology Methods**, v. 72, n. 1, p. 29-40, 1984.

TEMPONE, A. G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A. L.; MORTARA, R. A.; ANDRADE, H. F. J. R. Targeting *Leishmania* (L.) *chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 60-8, 2004.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, n.4, p. 147-160, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZAION (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. In: WHO Technical Report Series, n. 949. ed. Genebra, World Health Organization, 201 p., 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of leishmaniasis**. Disponível em: < http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_60.13_Eng.pdf>. Acessado em: 20 de dezembro de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> . Acesso em: 20 de dezembro de janeiro de 2015.

ZHANG, X., GONCALVES, R., MOSSER, D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. Curr Protoc Immunol. Chapter 14:Unit 14. 2008.

9 Anexos

9.1 ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 119/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 069/13

Projeto Pesquisa: “Formulação inovadora de lipossomas convencionais e furtivos contendo miltefosina e antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral”.

Pesquisador Responsável: Sydnei Magno da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 24 de Junho de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU