

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E EFICÁCIA *IN VITRO* DE FORMULAÇÕES
LIPOSSOMAIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO MILTEFOSINA E
ANTIMONATO DE MEGLUMINA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL

Marcela Rodrigues de Sousa Porta
Uberlândia
Fevereiro 2015

MARCELA RODRIGUES DE SOUSA PORTA

Preparo, caracterização e eficácia *in vitro* de formulações lipossomais de circulação prolongada contendo Miltefosina e Antimonato de Meglumina para o tratamento da Leishmaniose Visceral

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

Orientador: Profº Drº Sydnei Magno da Silva

Co-Orientador: Profº Drº Frédéric Jean Georges Frézard

Uberlândia
Fevereiro 2015

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

P839p
2015

Porta, Marcela Rodrigues de Sousa, 1990
Preparo, caracterização e eficácia in vitro de formulações lipossomais de circulação prolongada contendo Miltefosina e Antimonato de Meglumina para o tratamento da Leishmaniose visceral [recurso eletrônico] / Marcela Rodrigues de Sousa Porta. - 2015.

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.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.826>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Leishmaniose visceral. 3. Lipossomos. 4. Doenças - Tratamento. I. Silva, Sydnei Magno da, , (Orient.). II. Frézard, Frédéric Jean Georges, , (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa da Dissertação de Mestrado número 200 do PPIPA.**Data:** 27 de fevereiro de 2015**Discente:** MARCELA RODRIGUES DE SOUSA PORTA**Matrícula:** 11312IPA001**Título do Trabalho:** "Eficácia in vitro de formulações lipossomais de circulação prolongada contendo Miltefosina e Antimonato de Meglumina para o tratamento da Leishmaniose Visceral"**Área de concentração:** Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Às 9 horas do dia 27 de fevereiro do ano de 2015 no Bloco 8C sala 105 - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Prof. Dr. Raul Rio Ribeiro – UFJF, Dra. Renata Cristina de Paula – PÓS-DOC/UFU e Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva – ICBIM/UFU, orientador do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o presidente da banca Dr. Sydnei Magno da Silva apresentou a comissão examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público e concedeu ao(à) discente a palavra para exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

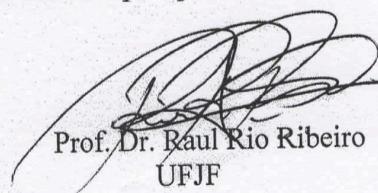
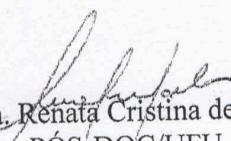
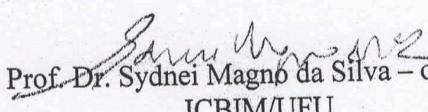
A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a banca examinadora considerou o(a) candidato(a) aprovado(a), sugerindo novo título para

trabalho: Preparo, caracterização e eficácia in vitro de formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina, na presença ou ausência de antimonato de meglumina, para tratamento da leishmaniose visceral.

Esta defesa de dissertação é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação interna da UFU, e do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa desta Universidade.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 14 horas e 40 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela banca examinadora.


Prof. Dr. Raul Rio Ribeiro
UFJF
Dra. Renata Cristina de Paula
PÓS-DOC/UFU
Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva – orientador
ICBIM/UFU

Dedico esse trabalho a minha mãe Sheila,
meu pai Renato, minha irmã Mariana e meu melhor amigo Olliver

AGRADECIMENTOS

A Deus, à vida e à ciência.

Aos meus pais, Sheila Rodrigues e Renato Porta, e irmã Mariana Rodrigues, por serem meus motivos de inspiração e pela torcida no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Marita Fazan Rossi, pela paciência, companheirismo e incentivo. Por acreditar em mim mesmo nos momentos que nem mesmo eu acreditei.

À colega e amiga, mestrandanda, Camila Oliveira, pela ajuda em toda parte experimental do projeto, pela disponibilidade constante em auxiliar e principalmente pela amizade sincera e momentos de descontração.

Às amigas Kelem Mota, Natália Nasser, Karen Ferraz, Maria Júlia Rodrigues e Daliane Faria pelo ótimo convívio, por tornarem o laboratório minha segunda casa e todos os conhecimentos divididos.

À técnica e amiga Juliana Miranda pela atenção e ajuda indispensáveis na realização prática dos experimentos.

Ao Professor Dr. Sydnei Magno da Silva pela confiança depositada em mim, pela orientação nesta pesquisa e por estar sempre disponível para ensinar.

À Professora Dra. Márcia Cristina Cury, por abrir espaço e me dar a 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.

À professora Dra. Maria Norma e ao Laboratório de Biologia de Leishmania da Universidade Federal de Minas Gerais, por me receberem tão bem. Em especial a Soraia, pela ajuda essencial no decorrer do trabalho.

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

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 do Recôncavo da Bahia; da professora Dra. Maria Norma Melo, da Universidade Federal de Minas Gerais; MSc. Soraia de Oliveira Silva, da Universidade Federal de Minas Gerais; Dra. Renata Cristina de Paula, da Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que representa um grave problema de saúde pública. A terapia com as drogas disponíveis demanda longo tempo de tratamento e apresentam diversos efeitos colaterais. Novas abordagens para o tratamento da LV têm sido sugeridas, como as baseadas em drogas leishmanicidas em formulações de lipossomas de circulação prolongada, a fim de aumentar sua eficácia terapêutica e reduzir os efeitos secundários. O objetivo deste estudo foi preparar, caracterizar e avaliar a eficácia, *in vitro*, de formulações lipossomais de ação prolongada contendo miltefosina e antimoniato de meglumina (AM) para o tratamento da LV. Os lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG) e os contendo miltefosina e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM) foram preparados a partir da incorporação de polímero DSPE-PEG 2000 na membrana das vesículas, pelo método de "desidratação e reidratação de vesícula". A eficácia das formulações peguiladas foi comparada com o AM encapsulado lipossomas convencionais (LAM), lipossomas "vazios" (Lemp), AM e miltefosina livres. A caracterização (diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (Z)) das formulações foi determinada por espectroscopia de correlação de fotões, a taxa de encapsulação de Sb por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite, e sua presença nas formulações foi confirmada por cromatografia em camada delgada (CCD). Os ensaios de citotoxicidade (CC_{50}) e atividade leishmanicida das formulações (CI_{50}) foram realizados em macrófagos murinos utilizando o método colorimétrico MTT, e em formas promastigotas de *Leishmania infantum* utilizando o método colorimétrico de redução da resazurina, respectivamente. Foi avaliada, ainda, a eficácia das formulações contra amastigotas intracelulares 24h, 48h, e 72h após o tratamento. HePC-PEG e HePC-PEG/AM tiveram diâmetro hidrodinâmico inferiores a 200nm, $IP < 0,3$ e $z < -30mV$. A análise por CCD sugeriu a presença da miltefosina nas formulações. HePC-PEG apresentou CC_{50} igual a 92,49 $\mu g/mL$ e HePC-PEG/AM igual a 103,09 $\mu g/mL$, ambas taxas maiores que a miltefosina livre (41,59 $\mu g/mL$), sugerindo menor toxicidade celular da droga em formulação lipossomal. O valor de CI_{50} para HePC-PEG foi igual a 33,19 $\mu g/mL$ e 33,05 $\mu g/mL$ para HePC-PEG/AM, enquanto para miltefosina livre o IC_{50} teve o valor de 49,59 $\mu g/mL$, sugerindo que a atividade leishmanicida da miltefosina nas formulações peguiladas manteve-se. Nos ensaios contra amastigotas intracelulares, as formulações peguiladas reduziram significativamente as taxas de infecção dos macrófagos em relação a AM, LAM, e Lemp, 72h após o tratamento, e em relação ao controle sem infecção, em todos os tempos avaliados. Em conclusão, as formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM apresentaram características de tamanho reduzido das vesículas, estabilidade elétrica, monodispersão, e significativa na redução das taxas de infecção de *Leishmania infantum*, *in vitro*.

ABSTRAT

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease that constitutes a serious public health problem. The therapy with the available drugs demands long treatment time and causes many side effects. New pharmacological approaches in the LV treatment have been suggested, such as those based on leishmanicidal drugs with liposomal formulations of prolonged circulation (stealth or PEGylated) seeking to increase therapeutic efficacy and reducing side effects. Therefore, the aim of this study was to prepare, characterize and evaluate, *in vitro*, the efficacy of PEGylated liposomal formulations containing miltefosine (HePC-PEG) and meglumine antimoniate (MA) (HePC-PEG/AM) for the LV treatment. PEGylated liposomes HePC-PEG and HePC-PEG/AM were prepared by the incorporation of the DSPE-PEG 2000 polymer in the vesicle membranes, using the DRV method. Effectiveness of the PEGylated formulations was compared with the conventional MA encapsulated-liposome (LAM), "empty" liposomes (Lemp), MA and "free" miltefosine. The characterization of the PEGylated formulations (hydrodynamic diameter, polydispersity index (PI) and zeta potential (Z)) were determined by photon correlation spectroscopy, the Sb encapsulation rate by graphite furnace atomic absorption spectrometry, and the presence of miltefosine in the formulations was determined by thin layer chromatography (TLC). The cytotoxicity concentration (CC₅₀) and inhibitory concentration (CI₅₀) assays of the formulations were evaluated in murine macrophages by MTT colorimetric method and in promastigote forms of *Leishmania infantum* by resazurin reduction colorimetric method, respectively. Also, the effectiveness of the formulations against intracellular amastigotes 24h, 48h and 72h after treatment was evaluated. The hydrodynamic diameter of the HePC-PEG and HePC-PEG/AM formulations were lower than 200nm, and PI<0,3 e z<-30mV. TLC analysis suggested the presence of miltefosine in the formulations. CC₅₀ of HepC-PEG was 92,49 µg/mL and for HePC-PEG/MA was 103,09µg/mL, both higher rates than miltefosine in its free form (41,59µg/mL), suggesting less cell toxicity of the drug in liposomal formulation. The CI₅₀ values were 33,19 µg/mL for HepC-PEG and 33,05 µg/mL for HePC-PEG/MA, whereas the free miltefosine IC₅₀ was 49,59 µg/mL, suggesting that the leishmanicidal activity of miltefosine in PEGylated formulations remained. In the tests with intracellular amastigotes, the PEGylated formulations significantly reduced macrophage infection rates for MA, LAM and Lemp in 72h after the treatment, and at all times evaluated when compared to uninfected control. In conclusion, HePC-PEG and HePC-PEG/MA formulations presented reduced vesicle sizes, electrical stability, monodispersity and significant reduction in *Leishmania infantum* infection rates, *in vitro*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização das formulações de lipossomas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas, índice de polidispersão, potencial Zeta e taxa de encapsulação de Sb.....	26
Tabela 2 - Valores de CC ₅₀ determinados para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e valores de CI ₅₀ determinados para formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> após incubação por 72 horas com formulações testadas.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prevalência da Leishmaniose visceral no mundo.....	1
Figura 2 - Estrutura química da miltefosina.....	9
Figura 3 - Curva de crescimento de <i>Leishmania infantum</i> cepa MHOM/BR/1967/BH46 em meio de cultura quimicamente definido α -MEM.....	23
Figura 4 - Imagem representativa da caracterização por espectroscopia de correlação de fôtons de um lote da formulação lipossomal peguilada contendo miltefosina (HePC-PEG). O gráfico mostra o diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas (Z-average size) e o índice de polidispersão da formulação (PDI).....	24
Figura 5 - Imagem representativa da caracterização por espectroscopia de correlação de fôtons de um lote da formulação lipossomal peguilada contendo miltefosina (HePC-PEG). O gráfico mostra o potencial zeta da formulação (Zeta potential).....	25
Figura 6 - Perfil cromatográfico da formulação lipossomal de circulação prolongada contendo miltefosina (HePC-PEG) e dos seus constituintes.....	27
Figura 7 - Cromatogramas obtidos por CLAE-FR utilizando coluna C5 (partículas de 5 μ m, 150 x 0.32 mm d.i.), detecção no UV_{215nm} , fase móvel $CH_3OH:H_2O$ (80:20); fluxo de 1mL/min, a 35°C.....	28
Figura 8 - Cinética de liberação do Sb encapsulado em lipossomas convencionais (LMA) (o) e lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG/AM) (l) durante 24 horas a 37°C.....	29
Figura 9 – Níveis séricos de transaminase pirúvica (TGP), transaminase oxalacética (TGO), uréria e creatinina de camundongos.....	30
Figura 10 - Viabilidade celular representada pelo CC_{50} correspondente a redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de MTT, em amostras de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C após incubação por 72horas. E concentração inibitória representada pelo CI_{50} correspondente a redução de 50% da população de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> em ensaios com resazurina após 72h de incubação.....	33

Figura 11 - Ensaio de eficácia de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM) contra amastigotas intracelulares de <i>Leishmania infantum</i> cepa MHOM/BR/1967/BH46 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	35
Figura 12 – Ensaio de eficácia de miltefosina, HePC-PEG e HePC-PEG/AM contra amastigotas intracelulares de <i>Leishmania infantum</i> cepa MHOM/BR/1967/BH46 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM: Antimoniato de meglumina.

CCD: cromatografia em camada delgada.

CC₅₀: Concentração citotóxica em 50%.

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal.

CHOL: colesterol.

CI₅₀: Concentração inibitória em 50%.

CLAE-FR: cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.

DCP: dicetilfosfato.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina.

DSPE-PEG2000: diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000.

HePC: miltefosina.

HIV: vírus da imunodeficiência humana.

IP: índice de poli dispersão.

LC: Leishmaniose cutânea.

LCM: Leishmaniose cutâneomucosa.

LT: Leishmaniose tegumentar.

LV: Leishmaniose visceral.

MLV: Vesícula multi lamelar

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

OMS: Organização Mundial de Saúde.

PBS: Tampão fosfato salino.

PSG: “*promastigote secreted gel*”.

RPM: rotações por minutos.

Sb: Antimônio.

Sb⁵⁺: Antimônio pentavalente.

SFB: Soro fetal bovino.

SMF: Sistema mononuclear fagocitário.

SUV: Vesícula unilamelar pequena.

TGP: Transaminase glutâmico oxalacética.

TGO: Transaminase glutâmico pirúvica.

α -MEM: Alpha Minimum Essencial Medium.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Leishmanioses.....	1
1.2. Ciclo biológico.....	3
1.3. Leishmaniose Visceral	4
1.4. Leishmaniose Visceral no Brasil	5
1.5. Tratamento	7
1.6. Miltefosina	8
1.7. Lipossomas como nanocarreadores de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral	9
2. Justificativa.....	11
3. Objetivo Geral	12
3.1. Objetivos específicos	12
4. Material e Métodos.....	13
4.1. Parasitos	13
4.2. Animais	13
4.3. Isolamento e Manutenção de <i>Leishmania infantum</i>	13
4.4. Curvas de crescimento de <i>Leishmania infantum</i> em meio de cultura.....	14
4.5. Preparo das formulações	14
4.5.1. Antimoniato de meglumina	14
4.5.2. Lipossomas convencionais contendo AM	14
4.5.3. Lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG)	15
4.5.4. Lipossomas peguilados contendo miltefosina e AM (HePC-PEG/AM) ..	16
4.5.5. Detecção de HePC nas formulações peguiladas por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.....	17

4.5.6. Ensaio de liberação de Sb das formulações lipossomais a 37°C	17
4.5.7. Ensaio piloto de toxicidade, <i>in vitro</i> , da miltefosina em formulações lipossomais peguiladas	18
4.6. Estudo da atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	18
4.6.1. Eficácia <i>in vitro</i> das formulações sobre a viabilidade das formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	18
4.6.2. Estudo da citotoxicidade <i>in vitro</i>	19
4.6.3. Ensaios de eficácia contra amastigotas intracelulares de <i>Leishmania infantum</i>	20
5. Análise estatística.....	21
6. Resultados	23
6.1. Curva de crescimento de <i>Leishmania infantum</i>	23
6.2. Caracterização dos lipossomas	24
6.3. Incorporação de HePC nas formulações	26
6.4. Cinética de liberação de Sb a 37°C	29
6.5. Ensaio piloto de toxicidade, <i>in vivo</i> , da miltefosina em formulações lipossomais peguiladas	30
6.6. Citotoxicidade em macrófagos murinos e atividade anti-promastigota.....	31
6.7. Atividade anti-amastigota intracelular.....	33
7. Discussão.....	37
8. Conclusões	45
9. Referências.....	47

1. Introdução

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses têm como agentes causadores protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, intracelulares obrigatórios, capazes de infectar diferentes espécies de mamíferos e neste se multiplicar. *Leishmania* (Ross, 1903) pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e é um parasito de importância médica e veterinária (WHO, 2014).

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 accidental (Ashford 1996; Saliba et al. 1999; Gramiccia et al. 2005; WHO, 2010).

Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas aos seus hospedeiros vertebrados por fêmeas de insetos dípteros, conhecidos como flebotomíneos, pertencentes à família Psychodidae (Subfamília: Phlebotominae), incluídas nos gêneros *Phlebotomus* - relacionadas com a transmissão do parasito no Velho Mundo - e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Lainson & Rangel 2005; WHO, 2010).

No homem, a manifestação clínica da doença é determinada pela espécie do parasito, da cepa e da resposta imune do indivíduo (Castellano, 2005). Dividido em dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*), existem mais de 30 espécies de *Leishmania* conhecidas até o momento, e aproximadamente 20 são patogênicas para os humanos (Ashford, 2000; Desjeux, 2004).

A doença pode apresentar distintas manifestações clínicas no hospedeiro vertebrado, sendo usualmente dividida em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutaneomucosa (LCM) e leishmaniose visceral (LV) (Silveira et al., 2004; Lainson & Shaw, 2005). Dentre as manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar (LT), a LC é considerada como sendo uma doença de menor importância, e se manifesta com um ou com vários nódulos na pele. A LCM apresenta uma maior gravidade, pois causa ulcerações mutilantes nas mucosas como: boca, nariz, faringe e laringe (Chappuis et al. 2007; Silveira et al. 2004). A LV é uma doença de curso crônico e na maioria dos pacientes, assintomática. Também conhecida como Calazar, é caracterizada por febre

alta, substancial perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia. Quando associada a condições debilitantes como infecções por HIV e desnutrição, se não diagnosticada e tratada adequadamente e em tempo, mais de 90% dos pacientes evoluem para o óbito (Desjeux, 2004; Chappuis et al. 2007; WHO, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) informa que as leishmanioses são um grupo de doenças endêmicas com altos índices de morbidade e mortalidade, e são consideradas doenças negligenciadas pelos sistemas de saúde dos países onde ocorrem. A OMS relata, ainda, a ocorrência de leishmanioses em 88 países, dos quais 79 são considerados subdesenvolvidos, com notificação compulsória em apenas 32 deles (WHO, 2010).

Há uma estimativa de prevalência global de 14 milhões de casos, e aproximadamente 350 a 400 milhões de pessoas em risco de se infectarem pelos parasitos. A incidência anual é de 1,5 a 2,0 milhões de casos, e destes, 1,0 a 1,5 milhões de pessoas são acometidas pela LT e cerca de 500.000 pela LV (Figura 1) em todo o mundo, das quais cerca de 59.000 indivíduos evoluem para o óbito (Alvar et al. 2006; WHO, 2010).

Por haver uma subestimação das leishmanioses como reais problemas de saúde, a doença se agrava em países que não possuem recursos para seu controle, proporcionando o avanço destas enfermidades. Por esse motivo, as leishmanioses constituem, atualmente, o segundo grupo mais comum de doenças parasitárias depois da malária, e estão entre as mais importantes doenças infecciosas combatidas pela OMS (WHO, 2010).

É alta a correlação entre a condição socioeconômica da população e a doença, e entre seus fatores de risco estão a baixa renda per capita, que contribui para aumentar os índices de morbidade e mortalidade, a pobreza, associada às condições precárias de moradia, a falta de saneamento e a coleta de lixo esporádica (Desjeux, 2004; Alvar et al. 2006; WHO, 2010).

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 (Ministério da Saúde, 2006).

Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. Provocam diversos efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, diarreia, artralgias, mialgias, anorexia, anomalias eletrocardiográficas, convulsões, elevação dos níveis de enzimas hepáticas, pancreatite química e nefrotoxicidade. Apesar disso, ainda são usados a mais de 60 anos (Chappuis et al. 2007). Com o surgimento de resistência aos antimoniais e sua alta toxicidade, novas terapias e diferentes práticas de tratamento estão sendo buscadas (WHO, 2010).

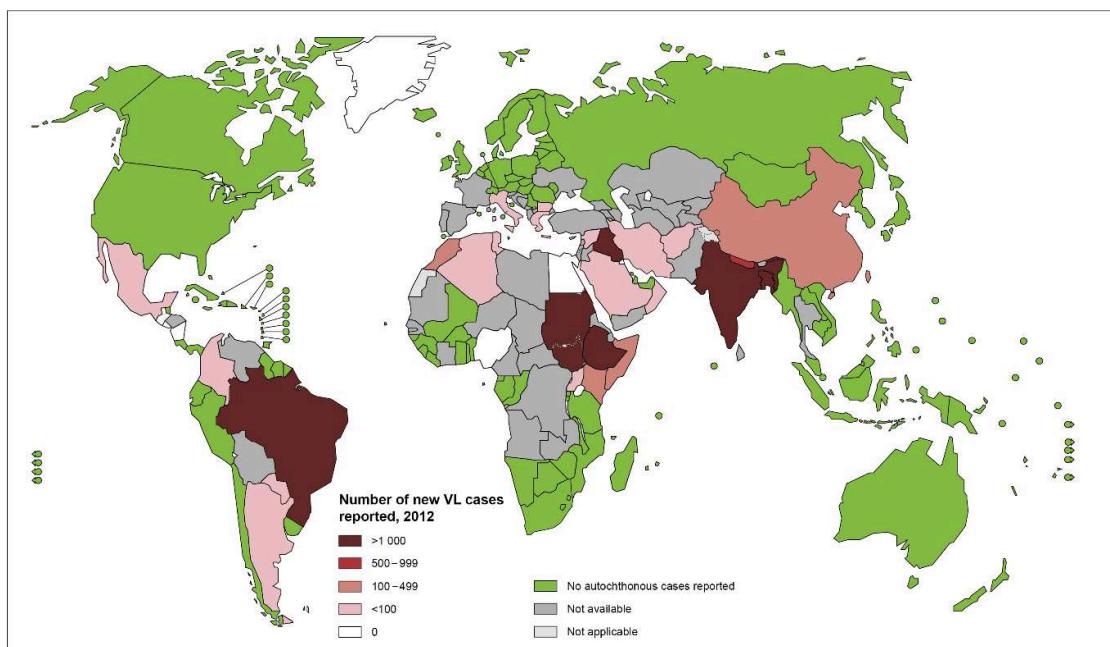


Figura 1 - Prevalência da Leishmaniose visceral no mundo, 2012 WHO

1.2.Ciclo biológico

Leishmania é um protozoário heteroxênico, ou seja, possui dois hospedeiros. Multiplicam-se por divisão binária e possuem duas formas evolutivas: (i) amastigota, ovalada, sem flagelo aparente e de desenvolvimento intracelular obrigatório, em células do sistema monocítico mononuclear fagocitário (SMF) dos hospedeiros vertebrados; (ii) promastigota, alongada e com flagelo aparente, no interior do tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (Sacks & Kamhawi, 2001; Bates, 2008).

O parasito é transmitido quando fêmeas adultas de flebotomíneos, espécies dos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo), se infectam ao realizar repasto sanguíneo em reservatório infectado, ingerindo as formas amastigotas

presentes nas células do SMF da pele. No interior do intestino médio do vetor, rapidamente ocorre a ruptura das células liberando as formas amastigotas que, após divisão binária, se transformam em promastigotas, que se dividem intensamente. As promastigotas passam por mudanças morfológicas e fisiológicas no tubo digestório do vetor. Parte dessa população se diferencia em formas metacíclicas, através de um processo chamado metacilogênese, onde há uma mudança do perfil de moléculas citoplasmáticas e de membrana do parasito, o que garante sua liberação do tubo digestório do inseto vetor, tornando-as infectantes ao hospedeiro mamífero (Pimenta et al. 1992; Sacks & Sher, 2002; Soares et al. 2005).

Após a metacilogênese, as promastigotas metacíclicas migram para a parte anterior do tubo digestório do inseto, onde produzem uma glicoproteína de consistência gelatinosa chamada PSG (*promastigote secretory gel*). Acredita-se que esse gel obstrua a passagem de alimento, quando do repasto sanguíneo-tissular, obrigando o flebotomíneo a regurgitar saliva juntamente com as formas promastigotas metacíclicas no local da picada (Bates, 2007).

A transmissão do parasito ocorre quando as fêmeas infectadas se alimentam em vertebrados susceptíveis e, durante o repasto sanguíneo, a saliva é regurgitada com as formas metacíclicas do parasito. Atraídos pela reação inflamatória formada no local, macrófagos fagocitam os parasitos, que perdem o flagelo e são internalizados no vacúolo parasitóforo, que se liga aos lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal, onde o parasito permanece em um ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais e metabólitos reativos do oxigênio. No entanto, devido a diversos mecanismos de evasão à resposta imune do hospedeiro, a *Leishmania* se adapta a sobreviver neste ambiente, onde se multiplica por divisão binária, até levar a ruptura da célula infectada e liberar formas amastigotas que são fagocitadas por outros macrófagos (Peters et al. 2008; Sacks & Sher, 2002).

1.3.Leishmaniose Visceral

As manifestações clínicas associadas à LV são atribuídas aos 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* possuem diferenças mínimas, não sendo possível a distinção entre elas por estudos bioquímicos e

moleculares. Assim, autores sugerem que as duas espécies devam ser consideradas como um grupo monofilético, adotando *L. chagasi* como sinonímia de *L. infantum* (Mauricio et al. 2001).

A LV é caracterizada pelos seguintes sinais e sintomas: surtos intermitentes de febre, tosse, perda de peso, letargia, aumento do baço e do fígado, anemia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, linfoadenopatia, epistaxe, diarréias e edemas (Reus et al. 2005; Artan et al. 2006; Del Olmo et al. 2009; WHO, 2010)

A coinfecção com o HIV é outro fator que tem contribuído para o aumento da prevalência e morbimortalidade da LV nos últimos anos, além de provocar o aparecimento de formas clínicas mais resistentes ao tratamento. Até março de 2010, 35 países apresentavam casos de coinfecção entre LV e HIV (WHO, 2010).

A doença é responsável pela perda de 2.357.000 “disability-adjusted life years” – DALY’s, marcador utilizado para avaliar o efeito de uma enfermidade na população, levando em conta mortes prematuras, horas de trabalho perdidas, gastos com tratamentos, dentre outros. Este marcador coloca a LV como a 9ª doença infecciosa mais importante do mundo (Alvar et al. 2006; WHO, 2010).

1.4.Leishmaniose Visceral no Brasil

Aproximadamente 90% das notificações das Américas acontecem no Brasil, sendo esse o país com maior incidência de LV zoonótica do mundo. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN), no ano de 2012 foram notificados 3.392 casos autóctones em 24 das 27 Unidades Federadas (Ministério da Saúde, 2014).

No período compreendido entre os anos de 1990 a 2011 foram notificados 69.466 casos de LV, com incidência de dois casos para cada 100.000 habitantes/ano, média de 3616 casos/ano, apresentando tendência ao crescimento. A letalidade média neste mesmo período foi de 6,1%, entretanto observou-se aumento de 100%, passando de 3,6% em 1994 para 7,4% em 2004 (Maia-Elkhoury et al. 2008; Romero & Boelaert, 2010, Ministério da Saúde, 2012). Segundo Costa (2008), ocorrem cerca de 200 a 300 óbitos anuais devido a LV no Brasil. O autor cita ainda que, embora a taxa de incidência anual venha aumentando discretamente, a letalidade aumentou significativamente nos últimos anos, mesmo com avanços médicos importantes e com o desenvolvimento de diretrizes específicas para os casos mais graves de LV (Costa, 2011).

Atualmente, é considerada doença reemergente, caracterizada por nítido processo de transição epidemiológica, com incidência crescente nas áreas onde ocorria tradicionalmente, expansão geográfica para os Estados mais ao sul do país e franco processo de urbanização em cidades localizadas nas regiões Nordeste e Sudeste, responsáveis pela maioria das notificações da doença (Alves & Bevilacqua, 2004; Costa 2008; Maia-Elkhoury et al. 2008; Ministério da Saúde, 2011). O processo de urbanização é nítido quando comparamos número de cidades com mais de cem mil habitantes que apresentavam mais de dez casos da doença/ano. Entre os anos 1980-1989 eram sete cidades, já no período 2000-2009 eram 41, representando um aumento de 585% (Costa, 2011).

Um fator crucial que deve ser levado em consideração no que diz respeito à incidência é a associação da LV com quadros de imunossupressão, como em pacientes transplantados e principalmente em pacientes com HIV/AIDS (Machado et al. 2009). De acordo com dados do SINAN, o número de casos de coinfecção tem aumentado significativamente, com média de 199 casos/ano entre os anos de 2007 e 2011, que representa um aumento de 947% 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).

O controle vetorial e o de reservatórios representam os maiores desafios para o controle da doença, 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. Tratamento

O tratamento da leishmaniose foi introduzido pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, com o uso do tártaro emético, antimonial trivalente (Vianna, 1912). Porém, por ser muito tóxico, sua utilização clínica foi suspensa. Desde então, esse medicamento sofreu alterações para minimizar os efeitos indesejáveis. Em 1940, os complexos de antimônio pentavalente (Sb^{5+}), menos tóxicos, foram introduzidos na quimioterapia das leishmanioses (Berman, 1997; WHO, 2010).

O antimonato de meglumina (AM) (Glucantime®, Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda, Brasil) é o derivado de Sb^{5+} utilizado no Brasil. Devido a sua baixa absorção oral e seu elevado “clearance” plasmático, este composto é administrado diariamente por via endovenosa ou intramuscular, por um período longo, de 20 a 40 dias (Ministério da Saúde, 2006).

Esse fármaco apresenta como efeitos colaterais náuseas, vômitos, diarreia, artralgias, mialgias, anorexia, anomalias eletrocardiográficas, convulsões, elevação dos níveis de enzimas hepáticas, pancreatite química e nefrotoxicidade. Além disso, o uso indiscriminado do medicamento resultou em seleção de parasitos resistentes, tendo sido relatado pacientes não responsivos à droga (Frézard et al. 2005; WHO, 2010).

Uma terapia alternativa utilizada é baseada na anfotericina B (AmB), um antibiótico que também apresenta toxicidade e, portanto, é melhor administrado em uma formulação lipossomal. Na forma lipossomal, AmB é muito efetiva e apresenta baixa toxicidade, porém não é aplicável em áreas com alta incidência da doença devido ao alto custo e difícil armazenamento (WHO, 2010).

Tendo em foco essas limitações, pesquisas estão sendo realizadas no intuito de elaborar novas formulações que auxiliem no avanço dos tratamentos já empregados. Estratégias baseadas na melhoria dos fármacos existentes são mais bem sucedidas do que o desenvolvimento de novas moléculas. Procura-se reduzir sua toxicidade, melhorando sua eficácia, além de utilizar vias de administração menos invasivas, como a oral (Frézard & Demicheli, 2010).

Um exemplo desse progresso é o uso de AM encapsulado em lipossomas, que são vesículas esféricas constituídas de bicamadas lipídicas que carreiam medicamentos. Estas têm propensão de serem fagocitados pelos macrófagos do fígado, baço e medula

óssea, locais de maior carga parasitária na LV, tornando o tratamento mais eficaz (Frézard et al. 2005).

1.6.Miltefosina

Miltefosina (hexadecilfosfocolina) (Figura 2) é um pó branco, anfifílico e zwiteriônico, ou seja, é eletricamente neutro, mas possui carga positiva devido a um grupo amina quaternária e um grupo fosfato carregado negativamente, solúvel em solventes aquosos e orgânicos (Dorlo et al. 2012). A miltefosina foi originalmente desenvolvida para o tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários. É uma alquilfosfocolina que age induzindo a morte celular por apoptose da célula tumoral, e que também apresenta potente atividade leishmanicida quando administrada oralmente (Croft et al. 2005).

O uso da miltefosina para tratamento da LV foi registrado pela primeira vez em 2002 no subcontinente Indiano (WHO, 2010). Embora o mecanismo de ação antitumoral da miltefosina tenha sido elucidado para células de mamíferos, sua citotoxicidade não foi determinada para *Leishmania* sp. (Verma & Dey 2004), mas sabe-se que causa morte por apoptose em *L. donovani* (Rakotomanga, 2007).

Vários estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostram que a miltefosina é citotóxica em ambos os estágios, promastigota e amastigota, para diferentes espécies de *Leishmania*. Ao contrário do tratamento padrão feito com os antimoniais pentavalentes, a miltefosina age independente do sistema imune, principalmente através da toxicidade direta contra o parasito (Griewank et al. 2010).

Desde 2002 o tratamento da LV a base de miltefosina oral encontra-se registrado na Índia e a sua identificação foi um importante avanço terapêutico por se tratar do primeiro agente oral realmente efetivo no tratamento dessa doença (Sundar, 1998; Jha et al. 1999; Sundar et al. 2002; Murray, 2004; Rahman et al. 2007).

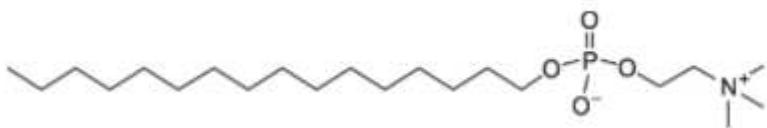


Figura 2 – Estrutura química da miltefosina (C₂₁H₄₆NO₄P; 407.568 g/mol; Sinônimos: Hexadecilfosfocolina; HePC). Fonte: PubChem

Embora seus principais efeitos colaterais sejam nefrotoxicidade e teratogenicidade, a miltefosina apresenta também distúrbios gastrointestinais, o que pode comprometer sua ação pela via administrada (Seifert & Croft, 2006). Por isso, uma formulação intravenosa capaz de concentrar a droga nos órgãos alvos do parasito (fígado, baço, medula óssea, linfonodos, dentre outros) é de grande interesse para pacientes que têm perturbações gastrointestinais. Além disso, autores sugerem maior eficácia da miltefosina lipossomal em relação sua forma livre (Papagiannaros et al. 2005).

1.7. Lipossomas como nanocarreadores de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral

Os lipossomas são vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo. A grande vantagem dos lipossomas em relação a outros sistemas carreadores de medicamento é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando estes são formados de lipídeos pertencentes às famílias de lipídeos naturais. Podem incorporar tanto fármacos hidrofílicos como lipofílicos, e, por serem sistemas altamente versáteis, o tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos (Frézard et al. 2005).

Outra característica importante é a tendência natural dos lipossomas de serem fagocitados pelos macrófagos do fígado, do baço e da medula óssea, o que torna esse sistema nanoestruturado ideal para o direcionamento de fármacos para os locais onde há maior densidade parasitária na LV (Frézard et al. 2005).

A eficácia terapêutica do AM encapsulado em lipossomas foi demonstrada em estudo utilizando esta formulação associada ao uso contínuo de alopurinol em cães infectados por *L. infantum*. O resultado foi a melhora significativa de alterações clínico-

patológicas, redução do número de parasitas e bloqueio da transmissão do parasito para o vetor até sessenta dias depois da última dose de alopurinol (Silva et al. 2012). Este estudo foi pioneiro ao demonstrar, pela primeira vez, a cura parasitológica da leishmaniose visceral canina em 50% dos animais tratados com AM encapsulado em lipossomas e alopurinol (Silva et al., 2012). Pelo fato da LV mostrar-se semelhante nos cães e no homem, é promissora esta mesma estratégia nos humanos.

Na evolução do emprego de lipossomas como carreadores de fármacos, algumas alterações foram realizadas na estrutura básica destes, possibilitando maior aplicação terapêutica. Na década de 1990, autores relataram que ao incorporar, na membrana das vesículas lipossomais, polímeros hidrofílicos sintéticos com cabeça polar constituída de etileno glicol (PEG), os lipossomas permaneciam por mais tempo na circulação. Essa nova classe de lipossomas foi chamada, então, de lipossomas peguilados, furtivos ou estabilizados estericamente (Klibanov et al. 1990; Allen & Hansen, 1991; Woodle & Lasic, 1992).

A modificação química da superfície das vesículas lipossomais com a incorporação do PEG proporciona: redução do nível de opsonização dos lipossomas; redução da velocidade de captação pelos macrófagos dos órgãos do SMF (fígado, baço, medula óssea); circulação prolongada no plasma sanguíneo; acúmulo preferencial em sítios de inflamação/infecção pelo fato destes sítios apresentarem uma permeabilidade vascular aumentada (Frézard et al. 2005; Tyagi & Ghosh, 2011).

Azevedo e colaboradores (2014), demonstraram pela primeira vez que os lipossomas peguilados contendo AM são mais eficazes do que os lipossomas convencionais para o tratamento de LV experimental. Também foi demonstrada uma nova estratégia de tratamento que se baseia na utilização de uma formulação mista de lipossomas peguilados e convencionais contendo AM.

2. Justificativa

A leishmaniose visceral é classificada como doença negligenciada pela OMS, e ocupa um lugar de destaque entre doenças parasitárias. Houve um significativo aumento do número de novos casos da doença ao longo dos últimos anos, além de expressiva expansão geográfica no mundo, transformando-se em grande problema de saúde pública em vários países. Isso torna importante o desenvolvimento de pesquisas e de novas estratégias que possam contribuir para o controle da doença.

A principal medida de controle de todas as formas de leishmanioses no homem continua sendo o tratamento. Novos compostos vêm sendo estudados para suprir a carência de opções terapêuticas e aperfeiçoar tratamentos já realizados. A eficácia e baixa toxicidade são fundamentais na busca desses novos tratamentos.

O uso de lipossomas no tratamento da LV permite que as drogas atinjam com eficiência e homogeneidade os órgãos e locais onde há maior densidade parasitária no corpo. Além do direcionamento para os órgãos alvos e o aumento de eficácia, o uso de formulações lipossomais permite doses terapêuticas menores que as convencionais e toxicidade reduzida, assim como menor risco de seleção de parasitos resistentes aos fármacos utilizados, um dos principais problemas relacionados a terapêutica convencional da LV.

Além disso, até onde vai nosso conhecimento, a literatura não apresenta relatos sobre eficácia de miltefosina em formulação lipossomal de ação prolongada, nem da associação de formulações lipossomais de ação prolongada contendo miltefosina e AM para o tratamento da LV.

3. Objetivo Geral

Preparar, caracterizar e avaliar a eficácia, em modelo *in vitro*, de formulações lipossomais de ação prolongada contendo miltefosina e antimoniato de meglumina para tratamento da leishmaniose visceral.

3.1. Objetivos específicos

- Estabelecer rotina de cultivo e manutenção de *Leishmania infantum* da cepa MHOM/BR/1967/BH46 no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.
- 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*.
- Comparar a eficácia dessas formulações contra *Leishmania infantum*, *in vitro*, com a do antimoniato de meglumina encapsulado em formulação lipossomal convencional.

4. Material e Métodos

4.1. Parasitos

Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa de referência da Organização Mundial de Saúde: *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1967/BH46), gentilmente cedida pela professora Maria Norma Melo, chefe do Laboratório de Biologia de *Leishmania* (Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - ICB/UFMG). Os parasitos foram mantidos em cultura no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia - ICBIM/UFU.

4.2. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal - CBEA/UFU e hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos de 6 a 8 semanas de idade provenientes do Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Os animais foram mantidos no CBEA/UFU, sobre condições adequadas de manejo, 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.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo CEUA/UFU (069/13) (ANEXO 1).

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 (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) a 24±1°C em garrafas plásticas de cultura celular de 25cm² (Sarstedt AG & Co., Alemanha). Subculturas (repiques) foram realizados a cada cinco dias.

Com o objetivo de preservar os fatores de virulência do parasito e padronizar os experimentos, foram utilizados parasitos até a sexta passagem em meio de cultura. Quando necessário 1x10⁷ promastigotas em fase estacionária de crescimento foram inoculados por via intraperitoneal em hamsters para posterior isolamento. Dois meses

após a infecção, os animais foram eutanasiados, o baço foi retirado de forma asséptica, homogeneizado em 1mL de meio α -MEM completo e o conteúdo transferido para um tubo de ensaio estéril contendo 2mL meio bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicolle) e mantidos a $24\pm1^{\circ}\text{C}$ em BOD. A cada 10 dias uma alíquota (10 μL) da cultura foi analisada por microscopia ótica para verificação da presença de parasitos viáveis. Confirmado o isolamento, os parasitos eram transferidos para garrafas contendo meio α -MEM completo e a cultura era expandida conforme a necessidade dos experimentos ou criopreservada no criobanco do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*.

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) e então aplicadas em câmara hemocitométrica (câmara de Neubauer). A contagem das promastigotas foi feita em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. A média aritmética dos quatro quadrantes para contagem de células 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

4.5.1. Antimoniato de meglumina

A síntese do AM foi realizada de acordo com metodologia proposta por Demicheli et al., (2003), utilizando quantidades equimolares de N-metil-D-glucamina e pentacloreto de antimônio (Sigma Aldrich Inc., EUA). O composto foi caracterizado quimicamente como antimoniato de meglumina e o teor de Sb (28% m/m) determinado por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (AA600, Perkin Elmer, EUA) no Laboratório de Biofísica dos Sistemas Nanoestruturados – LabNano/UFMG.

4.5.2. Lipossomas convencionais contendo AM

A produção e caracterização das formulações lipossomais foi realizada em colaboração com o LabNano/UFMG, sob a supervisão do professor Frederic Frézard.

A metodologia para a obtenção do AM encapsulado em lipossomas convencionais (LAM) está padronizada e tem sido utilizada rotineiramente pelo nosso grupo de pesquisa (Schettini et al. 2006; Ribeiro et al. 2008; da Silva et al. 2012). 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. Foi adicionada à suspensão de SUV sacarose na relação de 3g de açúcar por g de lipídeo, como criopreservante. Em seguida, foram congelados e liofilizados por 72h (Liofilizador modelo FreeZone 4.5, Labconco Corp., EUA). Os lipossomas liofilizados foram reidratados com solução aquosa de AM (80g de Sb/L). Esta mistura permaneceu incubada a 55°C durante 30min, e foi adicionada solução salina tamponada (PBS: NaCl 150mM, fosfatos mono e dissódico 10mM, pH 7.2), em volume igual ao utilizado de solução de AM. Ocorreu nova incubação por 30min a 55°C. 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 e ressuspêndido com solução salina estéril. Alíquotas 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 fôtons (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).

O mesmo procedimento foi realizado para o preparo dos lipossomas vazios (Lemp), utilizando-se PBS para reidratar as vesículas, ao invés de AM.

4.5.3. Lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG)

Para o preparo das formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina foi utilizada a metodologia de “Desidratação e reidratação de vesículas” ou DRV (Deydration Rehydration vesicles) com modificações (Frezard et al., 2012; Azevedo et al., 2014), utilizando os seguintes lipídeos: miltefosina (HePC) (Sigma Aldrich Inc., EUA), 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 foi formado o “filme lipídico” solubilizando os lipídios em clorofórmio (CH_3Cl)/formaldeído (CH_2O) em rotaevaporador com vácuo, a temperatura de 65°C por 60 minutos, para a completa evaporação dos solventes. Este processo gerou fino filme lipídico composto por vesículas multilamelares (MLVs - Multilamellar vesicles), que foi hidratado com água Milli-Q® a 65°C por 60 minutos. A suspensão foi submetida a 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 aquecido a 65°C, e submetido a nova extrusão (200nm). A suspensão foi centrifugada (25000 x g, 60 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. O pellet ressuspêndido em PBS estéril e a suspensão resultante armazenada a 4°C até o momento do uso.

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

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

As vesículas HePC-PEG foram preparadas utilizando os mesmos lípidos e razão molar descritos acima. A suspensão de SUVs (concentração lipídica de 55g/L) foi submetida a extrusão (100 nm) a 65°C seguido de adição de solução aquosa de AM (Sb^{5+} a 32g/L), congelamento e liofilização por 72h. O liofilizado foi reidratado com PBS e a suspensão submetida a extrusão (200 nm) e duas centrifugações (25000 x g, 60 min, 4°C), a fim de separar o AM não encapsulado. Em seguida, o sedimento foi ressuspêndido 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 fôtons, a eficiência de encapsulação do Sb foi determinada por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (AA600; PerkinElmer, Inc., EUA).

4.5.5. Detecção de HePC nas formulações peguiladas por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

Para confirmar a incorporação da miltefosina nas formulações lipossomais foi realizado 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 chromatoplacas 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 LaborThecnik, Alemanha) e 5 μL do sobrenadante foi aplicado na chromatoplaca.

Foi utilizado como fase móvel mistura de CHCl_3 / CH_3OH /trietylamina/ H_2O (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.

Além da análise por CCD, os lipídeos foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE – FR). Os lipídeos e a HePC, foram solubilizados em metanol grau CLAE (Tedia Company Inc., EUA) na concentração correspondente a utilizada para o preparo das formulações. Para registro dos perfis cromatográficos utilizou-se coluna Discovery® BIO Wide Pore C5 HPLC Column (partículas de 5 μm , 150 x 0.32 mm d.i.) (Sigma-Aldrich Inc., EUA) acoplada a um aparelho de CLAE (Shimadzu LC-20AT, Shimadzu Scientific Instruments, Japão), nas seguintes condições: detecção no $\text{UV}_{215\text{nm}}$, mistura de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:20) como fase móvel em fluxo de 1mL/min, e forno da coluna a temperatura constante de 35°C.

4.5.6. Ensaio de liberação de Sb das formulações lipossomais a 37°C

Com o objetivo de avaliar a taxa de liberação de Sb das vesículas para o meio aquoso da suspensão, as formulações de HePC-PEG/AM e LAM foram mantidas em estufa a 37°C e alíquotas foram retiradas para determinação da taxa de encapsulação de

Sb nos tempos 0, 1h, 5h, 24h e 7 dias, utilizando espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite (AA600, Perkin Elmer, EUA).

4.5.7. Ensaio piloto de toxicidade, *in vitro*, da miltefosina em formulações lipossomais peguiladas

Com o objetivo de avaliar a toxicidade das formulações peguiladas, camundongos Swiss, machos, 8 semanas de idade, foram tratados, por via intraperitoneal, de acordo com os seguinte grupo: (i) miltefosina - dose equivalente a 40mg/kg; (ii) HePC-PEG - dose equivalente a 40mg/kg de miltefosina (presente na formulação); e (iii) HePC-PEG/AM - dose equivalente a 40mg/kg de miltefosina (presente na formulação). Nos tempos zero, 4h, 8h, 12h e 24h após o tratamento, os animais (n=2 por tempo, de cada um dos grupos) foram anestesiados com associação de quetamina e xilazina para coleta de 1mL de sangue e, após as coletas, foram eutanasiados. O sangue foi transferido para um tubo de microcentrífuga com heparina, homogeneizado, e centrifugado a 3000 x g por 10 minutos para separação do plasma, que foi congelado a -20°C até o momento das análises.

As alíquotas de plasma foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL-UFMG), coordenado pelo professor Wagner Luiz Tafuri, para a realização dos seguintes exames, em um analisador bioquímico semiautomático (Labquest, Labtest Diagnóstica S.A., Brasil): 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) e transaminase oxalacética (TGO), importantes marcadores de toxicidade aguda.

4.6. Estudo da atividade leishmanicida *in vitro*.

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

A concentração inibidora (CI₅₀) 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 x 10⁵ parasitos/poços) foram semeadas em placas de 96 poços (Sarsted AG & Co., Alemanha) em meio completo de RPMI 1640 (meio RPMI1640 (Sigma Aldrich Inc., EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM L-glutamina, 100Uµg/mL de penicilina e

100 μ g/mL de estreptomicina e incubadas a 26°C com uma atmosfera de 5% de CO₂ (CO₂ 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 μ g/mL até 2,5 μ g/mL, baseado na concentração de HePC nas formulações. A formulação LAM foi diluída no volume correspondente a mesma concentração de Sb da formulação HePC-PEG/AM. A formulação Lemp foi diluída no mesmo volume determinado para as formulações pega-ladas, e o AM livre foi testado de 400 μ g/mL a 12,5 μ g/mL. Todos os compostos foram testados em triplicata para cada concentração. Parasitos não tratados foram utilizados para comparação viabilidade. As formulações foram então incubadas durante 24 h, 48h e 72h. Após incubação foi adicionado uma solução de resazurina a 10% v/v (0,15mg/mL em PBS) (Sigma-Aldrich Inc., EUA) nos poços e as placas foram incubadas durante 4h a 26°C com uma atmosfera de 5% de CO₂. 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.

4.6.2. Estudo da citotoxicidade *in vitro*

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Os macrófagos foram elicitados com injeção intraperitoneal de 2mL de tioglicolato 3% (Sigma-Aldrich Inc., EUA) para indução de uma resposta inflamatória. Após três dias, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi obtido o lavado da cavidade peritoneal com duas injeções de 5mL de meio RPMI 1640 e posterior recuperação do fluido (Zhang et al. 2008). O lavado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C (Centrifuga HERMLE, modelo 2323 K, HERMLE LaborThecnik, Alemanha), o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspêndido em meio RPMI 1640 completo. As células foram quantificadas em câmara hemocitométrica com o auxílio do corante vital azul de Tripan (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,4% p/v.

Apenas as células viáveis foram consideradas para cálculo do inóculo. O número de células/mL da amostra foi estimado como a média aritmética de duas contagens dos quatro quadrantes da câmara, multiplicado pelo inverso da diluição da amostra e por 10⁴.

Após a quantificação 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 possíveis células que não aderiram a placa (Tempone et al. 2004).

Os macrófagos foram expostos as formulações diluídas nas concentrações de 160 μ g/mL até 2,5 μ g/mL para miltefosina, HePC-PEG, HePC-PEG/AM (160-2,5 μ g/mL correspondente a concentração de miltefosina nas formulações), LAM e Lemp (mesmo volume calculado para miltefosina), e 400 μ g/mL a 12,5 μ g/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 24, 48 e 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 a partir dos dados obtidos em cada experimento.

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, com a concentração ajustada para 5×10^7 células/mL. Os parasitos (5×10^6 /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 fagocitadas 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 previamente. Os macrófagos infectados foram então incubados por 24, 48 e 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. Em seguida, as lamínulas foram retiradas dos poços, coradas por Panótico rápido (Laborclin®), montadas em lâminas com o auxílio de Bálsamo do Canadá (Vetec®), 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).

5. 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 apresentaram distribuição amostral do tipo normal, verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e, portanto, foram aplicados testes paramétricos para identificar diferenças estatísticas entre elas.

Para calcular os valores de CI₅₀ e CC₅₀, 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, nos diferentes tempos avaliados, utilizando o teste de análise de variâncias (Two-way ANOVA), seguido do teste de Tukey 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 de student para

localizar diferenças entre os grupos HePC-PEG/AM e LAM em cada tempo.

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

6. Resultados

6.1. Curva de crescimento de *Leishmania infantum*

A avaliação do perfil de crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* utilizadas nos experimentos foi realizada a partir da construção da curva de crescimento dos parasitos. Após o descongelamento de uma alíquota (1×10^6 promastigotas/mL) criopreservada em meio α -MEM completo foi realizada a contagem dos parasitos a cada 24h para a construção da curva, durante 15 dias, conforme metodologia previamente descrita. A figura 4 mostra a curva de crescimento da cepa MHOM/BR/1967/BH46. Nos testes de eficácia contra amastigotas intracelulares foi utilizada cultura na fase estacionária, rica em formas promastigotas metacíclicas, para a infecção dos macrófagos peritoneais. Para os estudos de atividade em promastigotas foram utilizados parasitos em fase exponencial de crescimento.

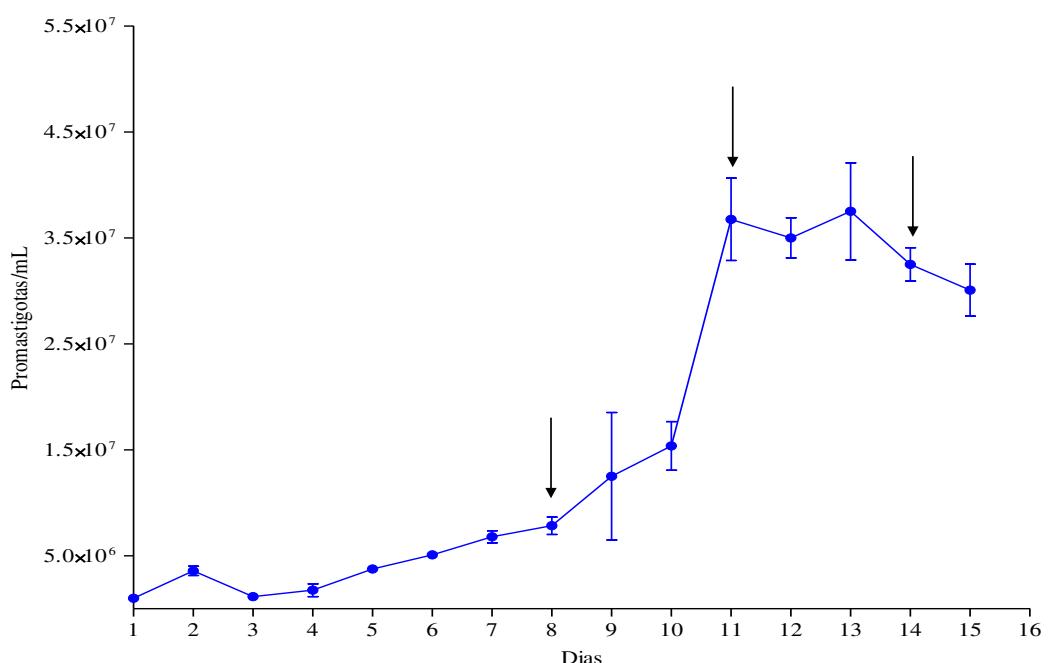


Figura: Curva de crescimento de *Leishmania infantum* cepa MHOM/BR/1967/BH46 em meio de cultura quimicamente definido α -MEM. Cada ponto representa a média mais desvio padrão de três contagens diárias. As setas indicam o início das fases exponencial (8º dia), estacionária inicial (11º dia) e estacionária tardia (14º dia).

6.2.Caracterização dos lipossomas

Alíquotas da suspensão de lipossomas foram utilizadas para determinar as principais características das amostras por meio de espectroscopia de correlação de fótons, como mostram as figuras 4 e 5.

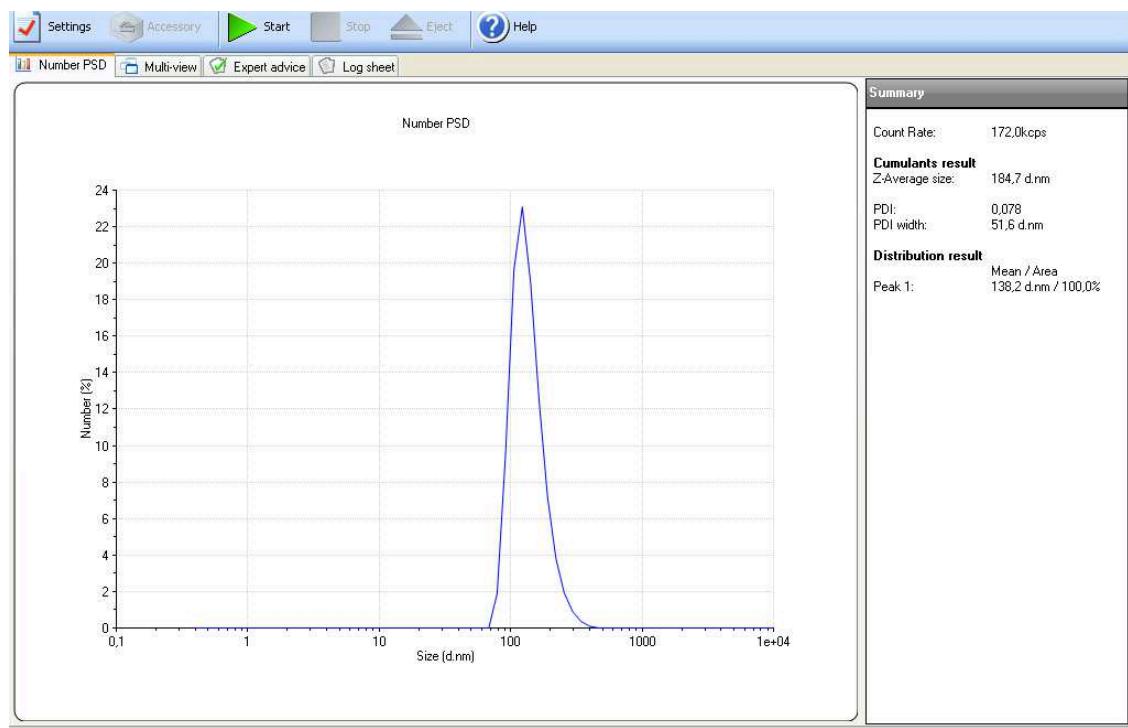


Figura 4 - Imagem representativa da caracterização por espectroscopia de correlação de fótons de um lote da formulação lipossomal peguilada contendo miltefosina (HePC-PEG). O gráfico mostra o diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas (Z-average size) e o índice de polidispersão da formulação (PDI)

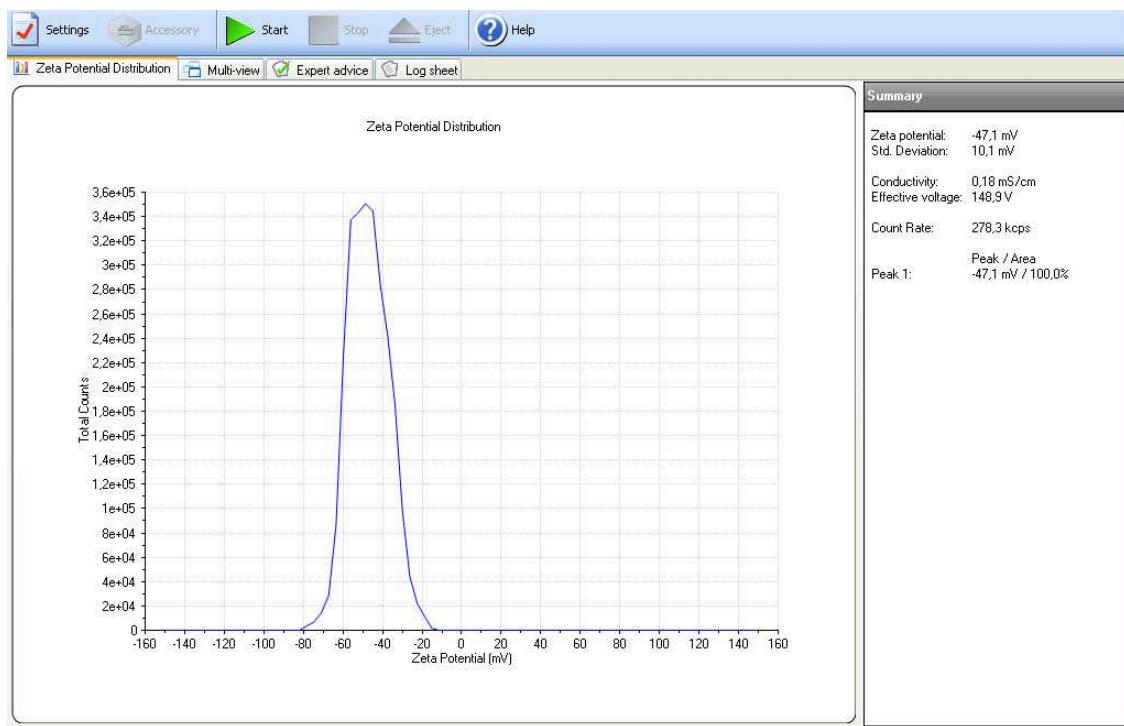


Figura 5 - Imagem representativa da caracterização por espectroscopia de correlação de fôtons de um lote da formulação lipossomal peguilada contendo miltefosina (HePC-PEG). O gráfico mostra o potencial zeta da formulação (Zeta potential)

A tabela 1 mostra a média dos resultados obtidos na caracterização de quatro lotes produzidos das formulações lipossomais em relação ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e taxa de encapsulação de Sb no momento do uso nos testes *in vitro*. HePC-PEG apresentou diâmetro hidrodinâmico médio igual a 171,9 nm, índice de polidispersão 0,079 e potencial zeta -63,5mV. A formulação HePC-PEG apresentou diâmetro hidrodinâmico médio igual a 166,4 nm, índice de polidispersão 0,053 e potencial zeta -64,6mV. LAM apresentou diâmetro hidrodinâmico médio igual a 172,9 nm, índice de polidispersão 0,154 e potencial zeta -69,7mV. A formulação Lemp apresentou diâmetro hidrodinâmico médio igual a 159,9 nm, índice de polidispersão 0,076 e potencial zeta -64,9mV. A taxa de encapsulação de Sb para LAM e HePC-PEG/AM foi de 22,5% e 25%, respectivamente.

Tabela 1 – Caracterização das formulações de lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG), lipossomas peguilados contendo miltefosina e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM), antimoniato de meglumina encasulado em lipossomas convencionais (LAM) e lipossomas vazios (Lemp) quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas, índice de polidispersão, potencial Zeta e taxa de encapsulação de Sb

Caracterização dos lipossomas*				
	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)	Taxa de encapsulação de Sb (%)
HePC-PEG	171,9 \pm 34,6	0,079 \pm 0,052	-63,5 \pm 16,1	NA ^a
HePC-PEG/AM	166,4 \pm 26,4	0,053 \pm 0,036	-64,6 \pm 15,1	25 \pm 2,0
LAM	172,9 \pm 29,9	0,154 \pm 0,081	-69,7 \pm 5,7	22,5 \pm 3,9
Lemp	159,9 \pm 61,8	0,076 \pm 0,027	-64,9 \pm 5,2	NA ^a

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

^a Não se aplica

6.3. Incorporação de HePC nas formulações

A figura 7 é representativa dos perfis cromatográficos em CCD das formulações peguiladas e de seus constituintes, utilizados como padrão de comparação. O padrão de manchas observado para HePC-PEG e HePC-PEG/AM foi semelhante e constante nos testes realizados em todos os lotes produzidos. Os resultados sugerem, ainda, a presença de todos os constituintes na formulação e ausência contaminantes. Além disso, não foi evidenciada a presença de HePC livre na fase aquosa da suspensão, sugerindo que não houve liberação da droga das vesículas lipossomais.

Entretanto, nas condições cromatográficas do ensaio HePC e DPPC apresentaram fatores de retenção (Rf - razão entre a distância percorrida pela amostra e distância percorrida pela fase móvel) muito semelhantes, não permitindo sua visualização separadamente no perfil cromatográfico das formulações.

Da mesma forma que nas análises por CCD, não foi possível diferenciar estes dois constituintes da formulação por CLAE-FR, pois apresentaram mesmo tempo de retenção e perfil cromatográfico semelhante (Figura 7) nas condições do ensaio.

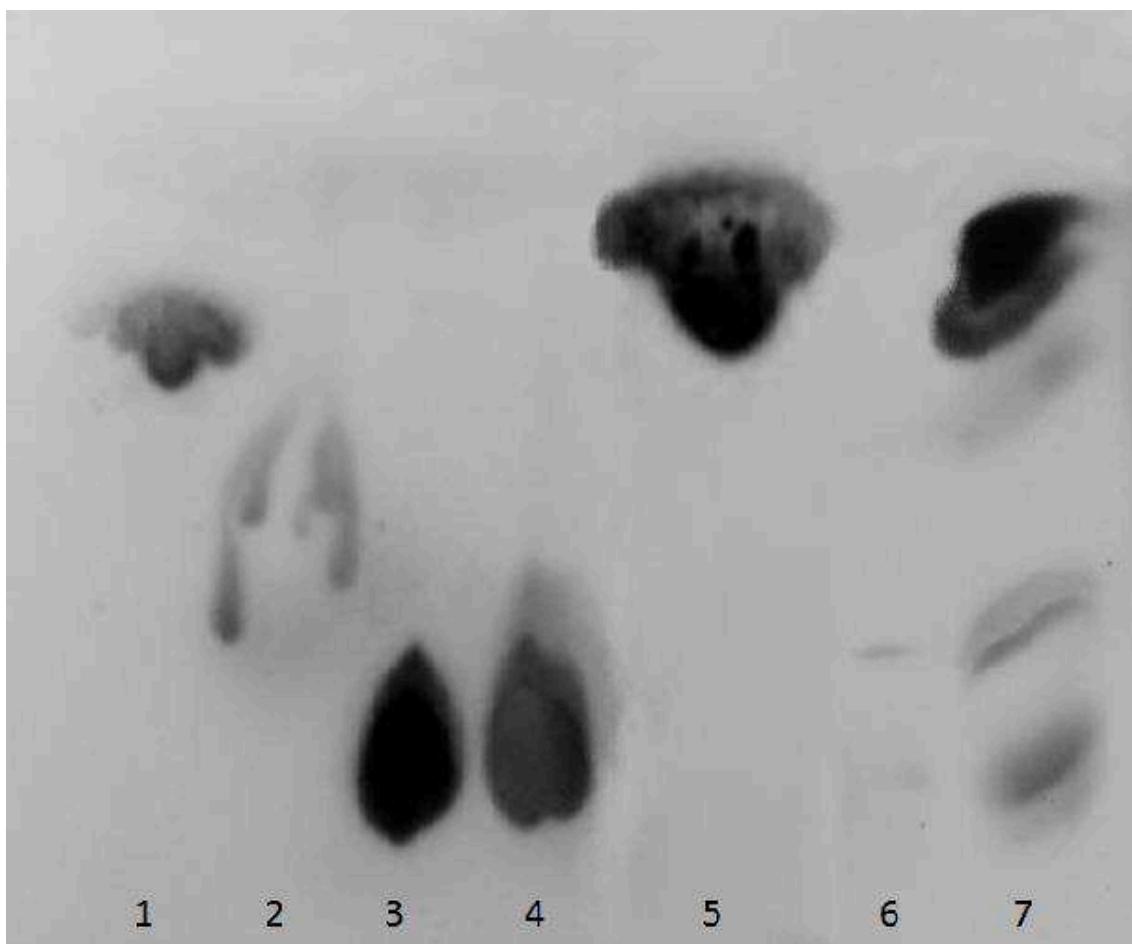


Figura 6 – Perfil cromatográfico da formulação lipossomal de circulação prolongada contendo miltefosina (HePC-PEG) e dos seus constituintes. 1) DCP; 2) DSPE-PEG 2000; 3) HePC; 4) DPPC; 5) CHOL; 6) Fase aquosa da formulação de HePC-PEG; 7) HePC-PEG. Fase estacionária: Sílica Gel 60; Fase móvel: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{trietylamina}/\text{H}_2\te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

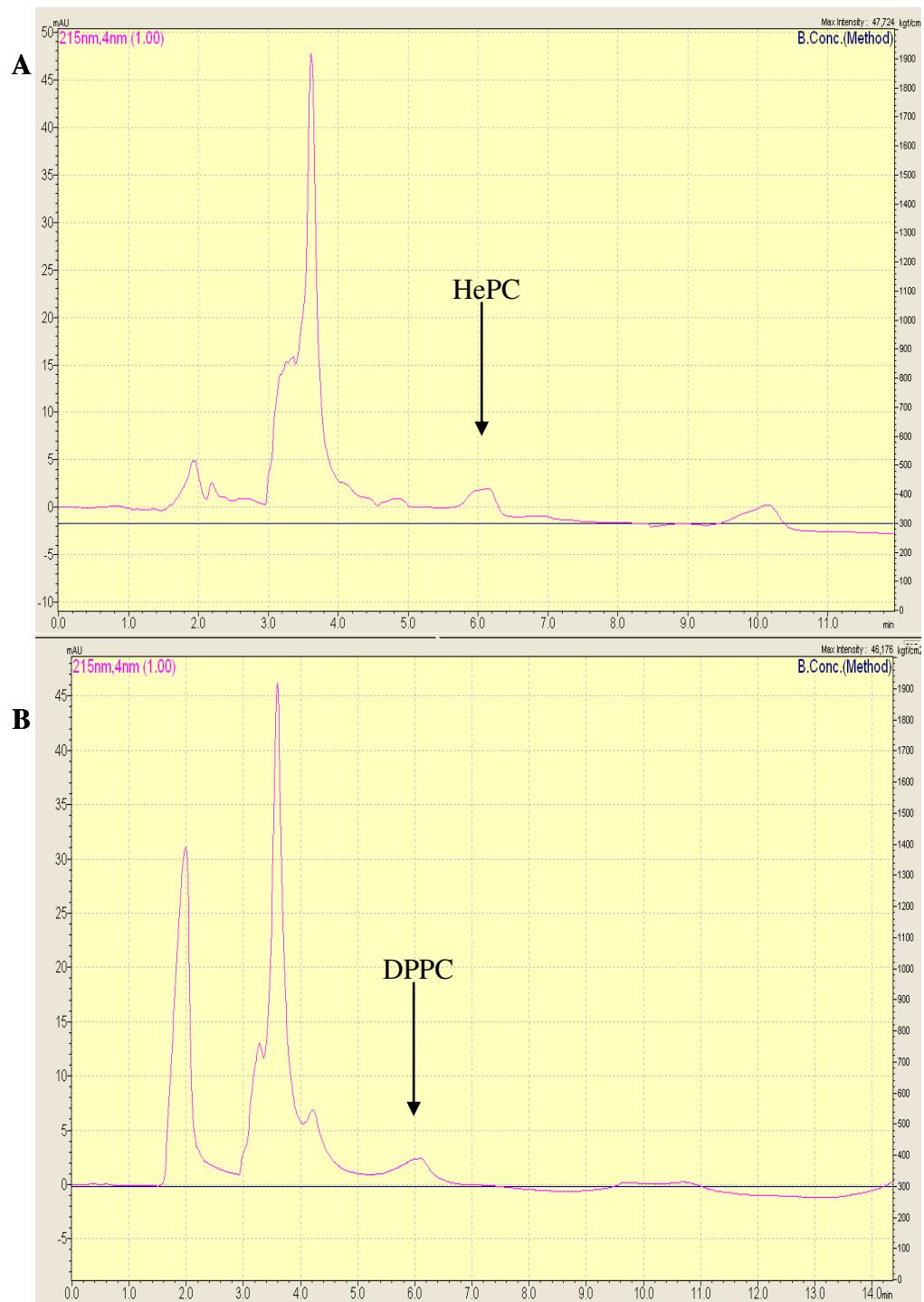


Figura 7 – Cromatogramas obtidos por CLAE-FR utilizando coluna C5 (partículas de 5 μm , 150 x 0.32 mm d.i.), detecção no UV_{215nm}, fase móvel CH₃OH:H₂O (80:20); fluxo de 1mL/min, a 35°C. (A) miltefosina (HePC) e (B) DPPC

6.4.Cinética de liberação de Sb a 37°C

Os resultados da cinética de liberação do Sb a 37°C durante 24h estão demonstrados na figura 8.

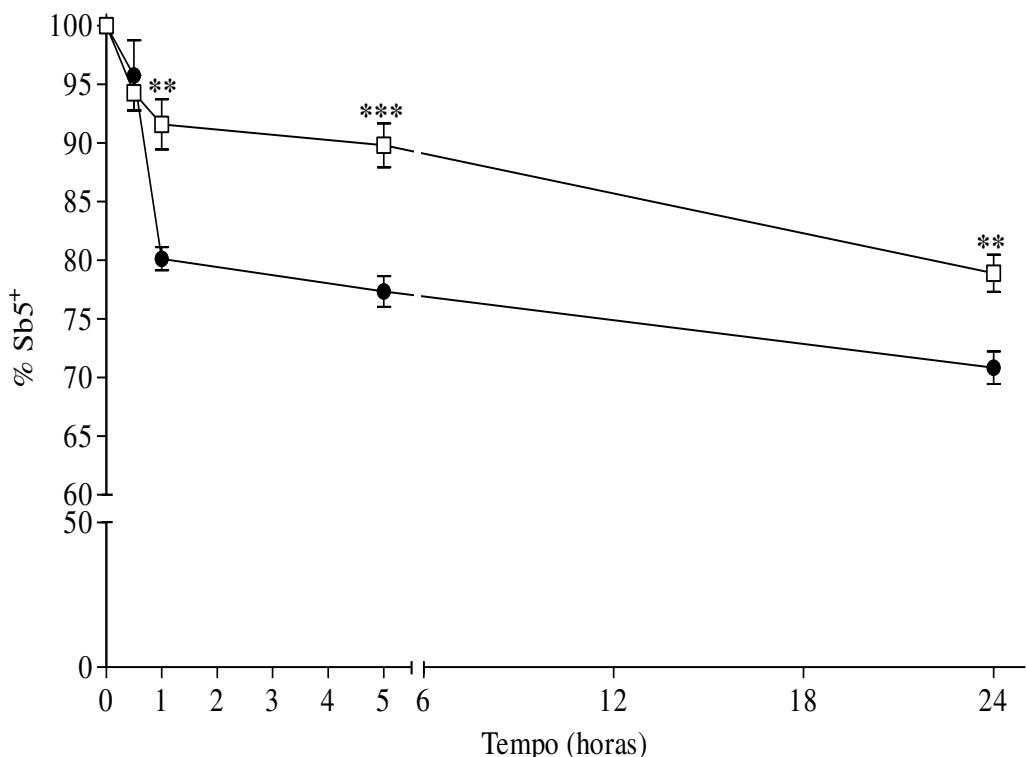


Figura 8 - Cinética de liberação do Sb encapsulado em lipossomos convencionais (LMA) (□) - taxa de encapsulação de Sb = 22,5% - e lipossomos peguilados contendo miltefósina (HePC-PEG/AM) (●) - taxa de encapsulação de Sb = 28,5% - durante 24 horas a 37°C. Percentual de encapsulação de Sb nas formulações determinado por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite, nos tempos 0, 30 minutos, 1h, 5h e 24h após o preparo. Resultados representados como média e desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata. ** (p<0,01) ; *** (p<0,001), Teste T não pareado

No ensaio observou-se um maior percentual de liberação de Sb para meio aquoso na formulação LAM em relação a HePC-PEG/AM, em todos os tempos avaliados. A partir do tempo 1h até 24h, esta diferença de liberação foi significativamente menor na HePC-PEG/AM. Após uma semana (168h), nas mesmas condições, a taxa média do Sb encapsulado nas vesículas foi de 32,4% para LAM e 24,4% para o HePC-PEG/AM em relação ao tempo 0 (100% de Sb encapsulado), não havendo diferenças significativas entre estes valores.

6.5. Ensaio piloto de toxicidade, *in vivo*, da miltefosina em formulações lipossomais peguiladas

Os resultados do ensaio piloto de toxicidade das formulações lipossomais peguiladas para camundongos Swiss estão demonstrados na figura 9

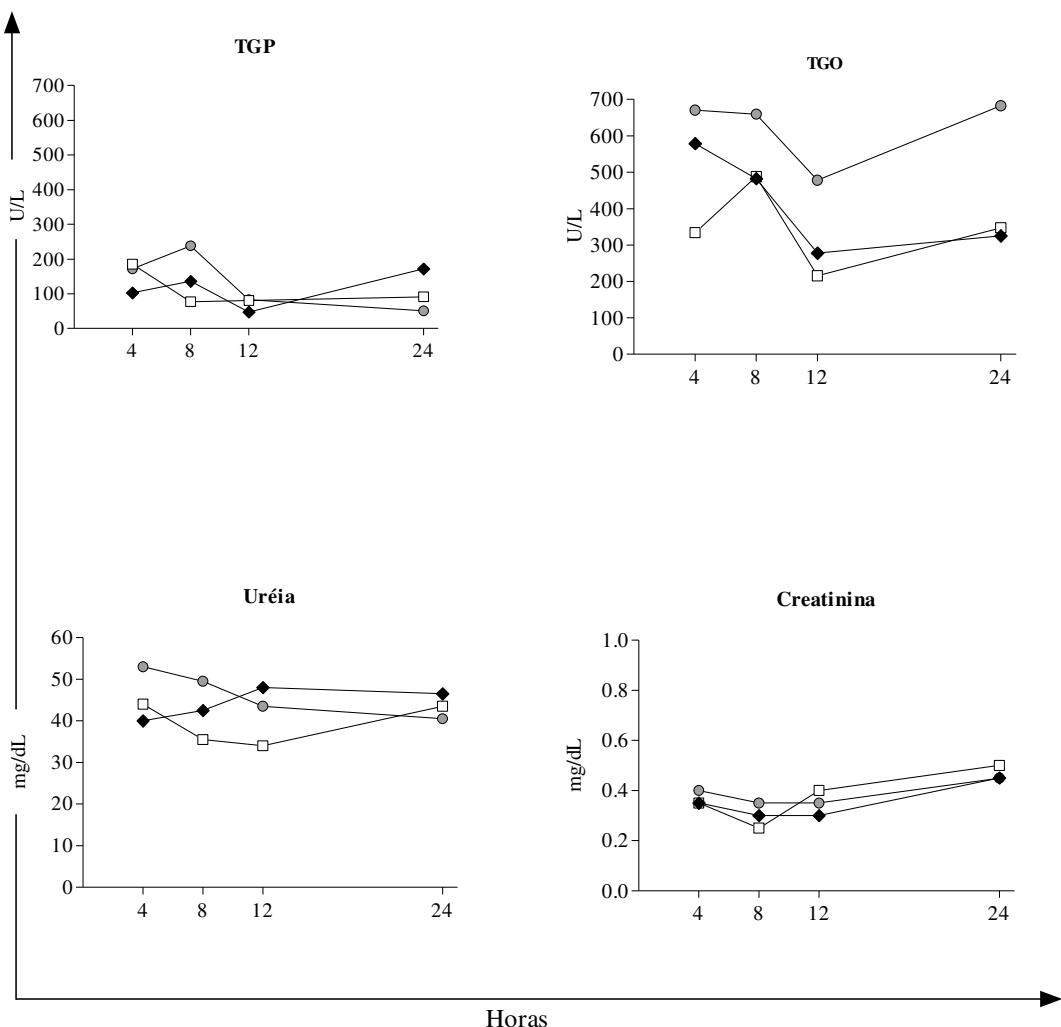


Figura 9 - Níveis séricos de transaminase pirúvica (TGP), transaminase oxalacética (TGO), uréia e creatinina de camundogos Swiss, após aplicação intraperitoneal das formulações peguiladas de contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM). (●) miltefosina - 40mg/kg; (□) HePC-PEG - 40mg/kg de miltefosina; (◆) HePC-PEG/AM - 40mg/kg de miltefosina. Figura representativa da média de 2 amostras por grupo em cada tempo

Os resultados de avaliação das transaminases são sugestivos de toxicidade hepática aguda e transitória. De maneira geral, nos grupos tratados com as formulações peguiladas e com miltefosina livre, os níveis séricos elevados das enzimas hepáticas TGP e TGO, foram semelhantes durante todo o ensaio. Inicialmente apresentaram

aumento transitório nas primeiras 8 horas do ensaio, redução no tempo 12h, e mantiveram-se estáveis até o tempo 24h.

Entretanto, os níveis de TGO foram, em média, mais elevados nos animais tratados com miltefosina que os obtidos no plasma dos camundongos tratados com HePC-PEG e HePC-PEG/AM, durante as 24h do ensaio. Nos tempos 8h, 12h e 24h, os valores de TGO nos camundongos tratados com miltefosina foram cerca de 1.4, 1.7 e 2.1 vezes maior que os obtidos para as formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM. A avaliação da função renal foi determinada pela mensuração dos níveis séricos de ureia e creatinina. Ambas as formulações HePC-PEG, HePC-PEG/AM e a miltefosina apresentaram valores médios semelhantes em todos os tempos analisados para creatinina. HePC-PEG/AM apresentou um discreto aumento nas primeiras 12h nos níveis de ureia permanecendo assim até o tempo 24h. Entretanto, no final do ensaio, os níveis séricos de ureia foram semelhantes para miltefosina e as formulações peguiladas.

6.6.Citotoxicidade em macrófagos murinos e atividade anti-promastigota

A tabela 2 mostra os valores da concentração citotóxica para 50% dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (CC₅₀) na presença das formulações e o valor da concentração capaz de reduzir em 50% o número de formas promastigotas de *Leishmania infantum* (IC₅₀). As formulações HePC-PEG (92,49 µg/mL) e HePC-PEG/AM (103,09 µg/mL) mostraram CC₅₀ maiores que a miltefosina (41,49 µg/mL), sugerindo menor toxicidade celular das drogas lipossomais em relação a sua forma livre.

Apesar da baixa toxicidade, o poder leishmanicida das formulações não foi alterado. Com CI₅₀ iguais a 33,19 µg/mL para HePC-PEG, 33,05 µg/mL para HePC-PEG/AM e 33,95 µg/mL para LAM, enquanto para miltefosina livre o IC₅₀ teve o valor de 49,59 µg/mL.

IC₅₀ do AM não foi determinado pois a forma pentavalente apresenta pouca toxicidade para formas promastigotas. É necessária uma conversão para forma mais tóxica, a trivalente, no local de ação, ou seja, no interior de macrófagos (Goodwin & Page, 1943).

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

	CC ₅₀	CI ₅₀
$\mu\text{g/mL}$		
Miltefosina	41,59	49,59
HePC-PEG	92,49	33,19
HePC-PEG/AM	103,09	33,05
AM	71,25	ND ^c
LAM	69,21	33,95
Vazio	66,28	19,37

^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

^cNão determinado

A figura 10 demonstra os gráficos representativos das curvas construídas para calcular os CC₅₀ e CI₅₀ da miltefosina e HePC-PEG.

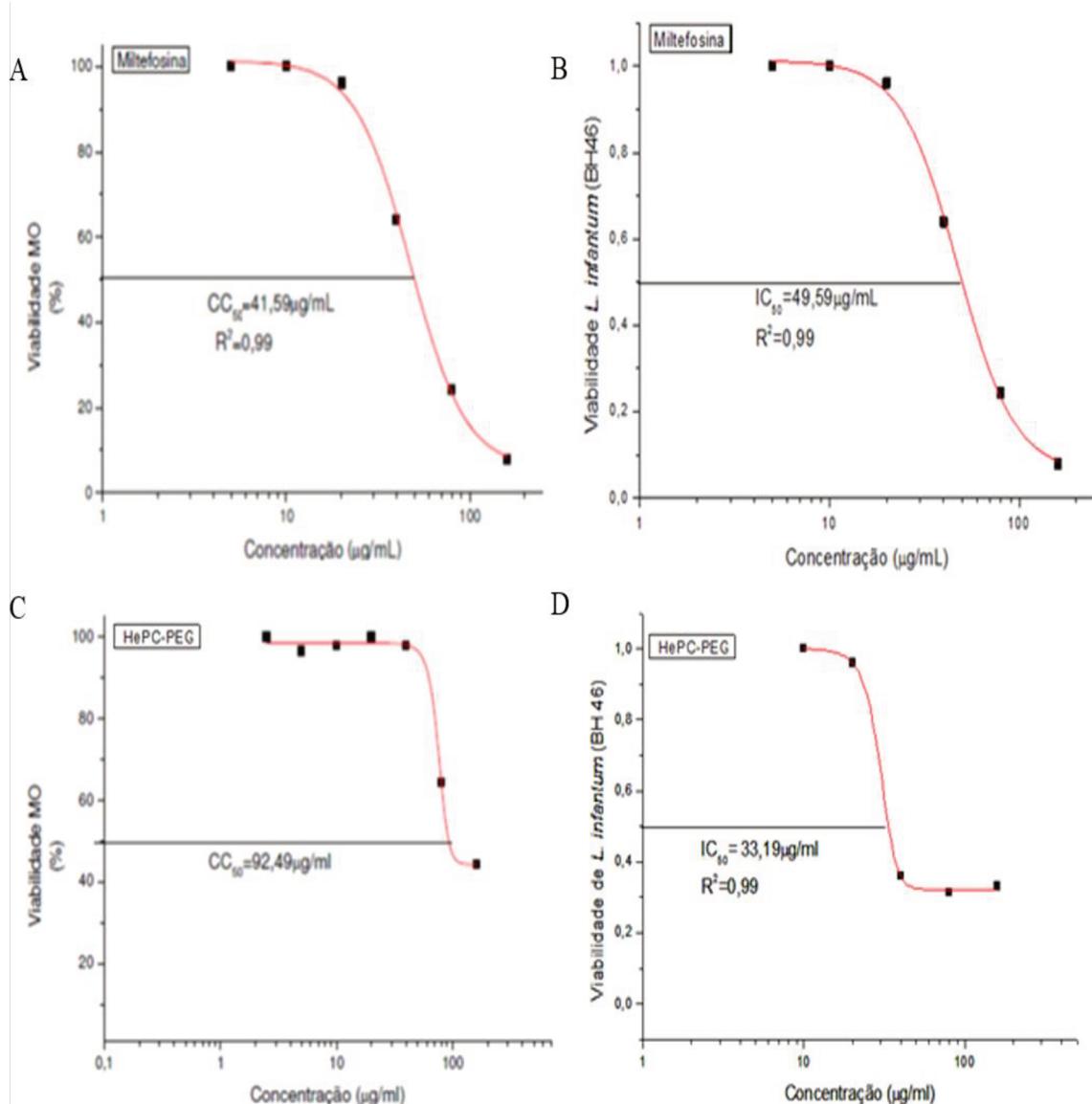


Figura 10 - Viabilidade celular representada pelo CC₅₀ correspondente a redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de MTT, em amostras de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C após incubação por 72horas. Concentração inibitória representada pelo CI₅₀, correspondente a redução de 50% da população de promastigotas de *Leishmania infantum* em ensaios com resazurina após 72h de incubação. CC₅₀ para miltefosina (A), CI₅₀ para miltefosina (B) e CC₅₀ para HePC-PEG (C), CI₅₀ para HePC-PEG (D). Figura representativa de três experimentos independentes em triplicata. Os valores de CC₅₀ e CI₅₀ foram determinados por regressão não linear considerando $r^2 \geq 0,95$

6.7. Atividade anti-amastigota intracelular

Após a determinação do CC₅₀ e CI₅₀, a eficácia *in vitro* das drogas foi avaliada em modelo de amastigotas intracelulares. O índice terapêutico (IT), ou razão entre CC₅₀/CI₅₀, foi escolhido para determinar as concentrações utilizadas no ensaio. Como o IT da miltefosina usada como fármaco leishmanicida referência foi menor que 2, foi determinado de forma empírica a concentração a ser utilizada baseado em um IT de 10,

levando em consideração a CC₅₀ determinada para a miltefosina no ensaio de 72h. Baseado nisso, a concentração de miltefosina, HePC-PEG e HePC-PEG/AM utilizada nos testes foi de 10 µM. No caso da LMA foi utilizado o mesmo volume calculado para as formulações pegauidas. A figura 11 é representativa do efeito das drogas em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*.

Os dados demonstraram que HePC-PEG e HePC-PEG/AM em concentração de 10 µM apresentaram redução significativa das taxas de infecção dos macrófagos nos três tempos avaliados em relação ao grupo controle (p<0,05). Já a miltefosina, na mesma concentração, reduziu a taxa de infecção em relação ao controle de maneira significativa nos tempos 24h e 72h (p<0,05). Não houve diferença entre as formulações lipossomais e a miltefosina nos tempos avaliados.

O resultado mais expressivo foi obtido pelas formulações pegauidas HePC-PEG, HePC-PEG/AM no tempo 72h, quando foram capazes de reduzir de forma significativa as taxas de infecção de macrófagos em relação ao controle, e aos macrófagos tratados com AM, LAM e Lemp (p<0,001). No mesmo tempo, a miltefosina foi capaz de reduzir de forma significativa a taxa de infecção dos macrófagos em relação ao controle, Lemp e AM (p<0,001).

A formulação LAM somente apresentou redução significativa da taxa da infecção de macrófagos em relação ao controle no tempo 48h (p<0,05). Já o AM livre e o Lemp não apresentaram redução significativa na taxa de infecção em nenhum dos tempos avaliados em relação ao grupo controle.

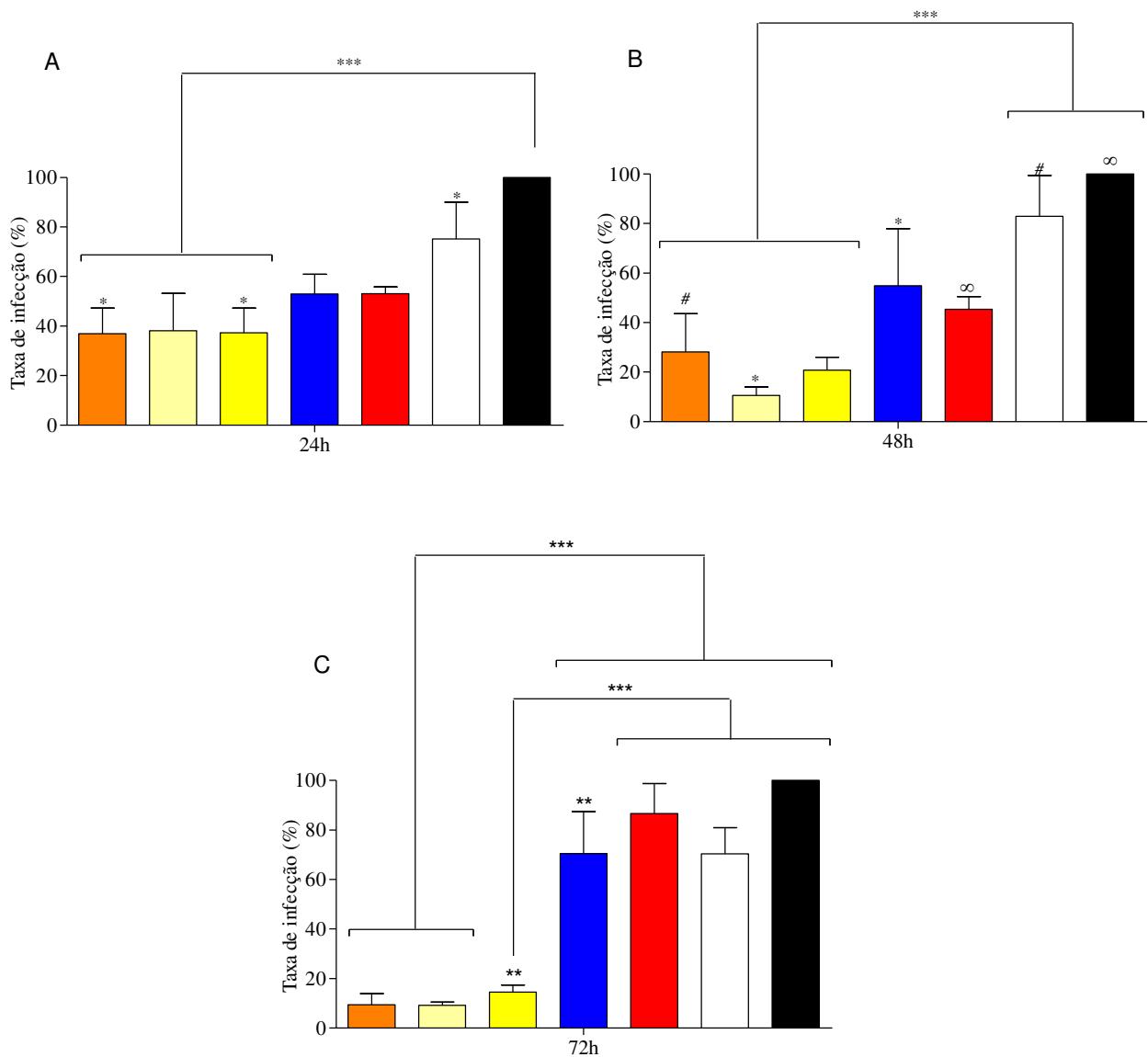


Figura 11 - Ensaio de eficácia de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM) contra amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1967/BH46) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Macrófagos expostos a: ■ 10µM de miltefosina em HePC-PEG; ■ 10µM de miltefosina em HePC-PEG/AM; ■ 10µM de miltefosina livre; ■ 16 µg/mL de AM encapsulado em lipossomais convencionais (LMA); ■ Lipossomais vazios (Lemp) no mesmo volume do LMA; ■ 150 µg/mL de AM; ■ Macrófagos infectados sem exposição a drogas; Tempo de exposição as drogas: 24h (A); 48h (B) e 72h (C). Barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata para cada tempo. * $p<0,05$; ** $(p,0,01)$; *** $p<0,001$; # $p<0,05$; ^ $p<0,05$, Two-way ANOVA, pós teste de Bonferroni

As formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM, como sugere a figura 12, foram capazes de promover redução na carga parasitária sem alteração na morfologia dos macrófagos.

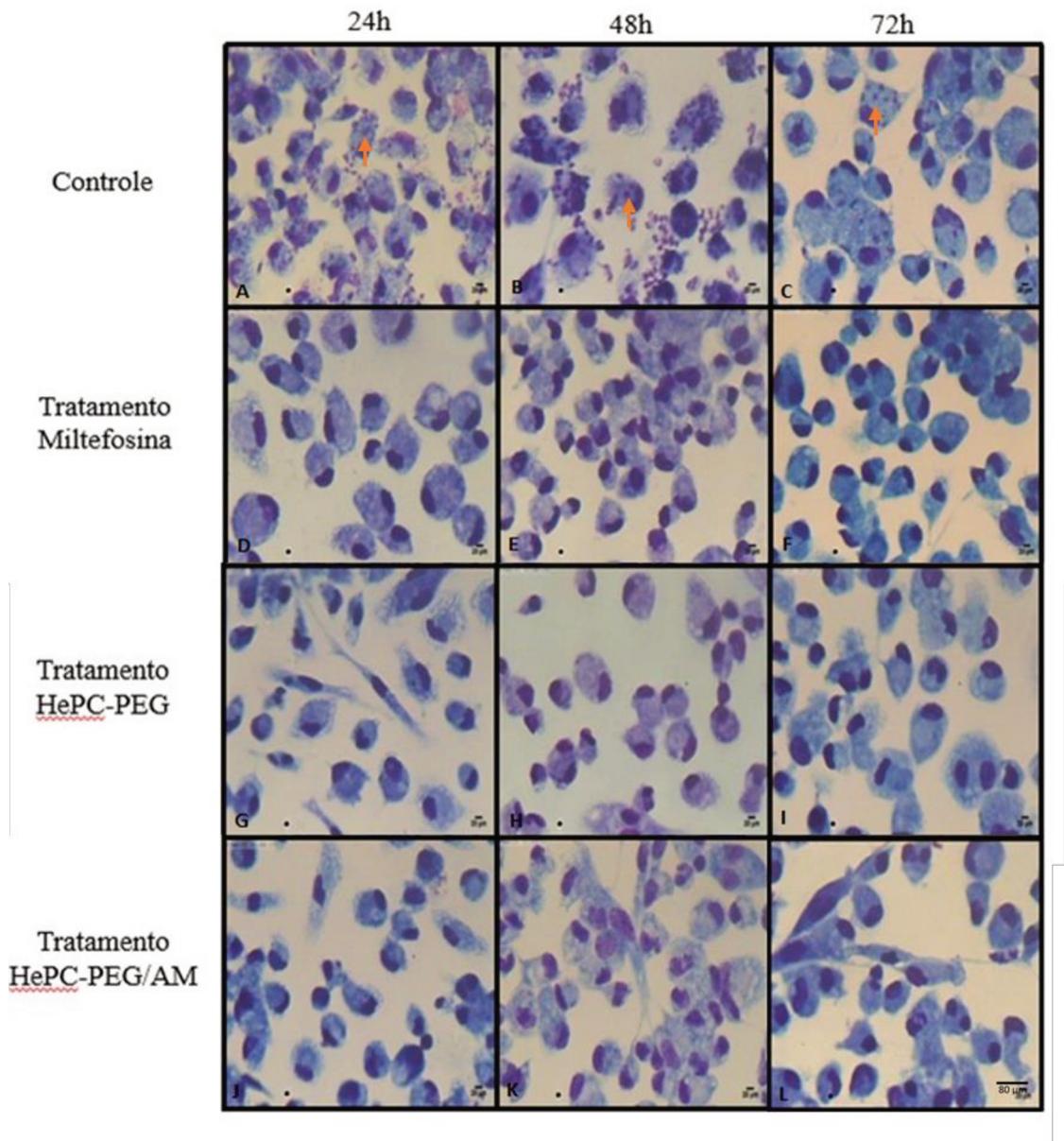


Figura 12 – Ensaio de eficácia de formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina (HePC-PEG) e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM) contra amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1967/BH46) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Controle =Macrófagos infectados sem exposição a drogas durante 24h (A); 48h (B) e 72h (C); macrófagos expostos a 10 μ M miltefosina durante 24h (D), 48h (E) e 72h (F); macrófagos expostos a 10 μ M de miltefosina em formulação lipossomal HePC-PEG durante 24h (G), 48h (H) e 72h (I); macrófagos expostos a 10 μ M de miltefosina em formulação lipossomal HePC-PEG/AM por 24h (J) 48h (K) e 72h (L). As setas indicam as formas amastigotas intracelulares. Figura representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Barra = 80 μ m; Aumento 1000X

7. Discussão

Dentro das leishmanioses, a LV apresenta-se como a forma mais grave da doença. E o tratamento continua sendo a principal medida de controle de todas as formas de leishmanioses no homem. Com o aumento de número de casos de LV e a resistência aos fármacos de primeira escolha, terapias alternativas estão sendo estudadas na busca de tratamentos mais rápidos e eficazes.

A partir da obtenção da cepa *Leishmania (L.) infatum* (MHOM/BR/1967/BH46) via colaboração com o Laboratório de Biologia de *Leishmania* (ICB/UFMG), foi possível iniciar o cultivo e a manutenção do parasito no nosso laboratório, permitindo assim a criação do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do ICBIM/UFU. Para o cultivo do parasito utilizou-se o meio quimicamente definido α -MEM. O meio α -MEM é um meio que contém ribonucleosídeos, deoxiribonucleosídeos, sais minerais, aminoácidos, vitaminas e bicarbonato de sódio, capaz de promover a multiplicação uniforme, sem alterações químicas ou morfológicas de *Leishmania infantum* (Kar et al., 1990). Outro fator determinante para a escolha do meio foi que o α -MEM não causou nenhuma interferência nos ensaios *in vitro* deste trabalho.

A partir da construção da curva de crescimento, conseguimos criar um perfil de desenvolvimento do nosso parasito. Foi possível identificar as fases de crescimento (fase log), fase estacionária e fase de declínio do parasito (fase lag). Foi a partir da curva que selecionamos o melhor momento para uso dos parasitos nos ensaios.

Além de possibilitar a realização deste trabalho, o estabelecimento da rotina de cultivo e manutenção de *L. infantum* Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do ICBIM/UFU permitiu que nosso grupo de pesquisas estabelecesse várias colaborações com pesquisadores de outras instituições como UFMG, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG), entre outros. Estas colaborações são voltadas, principalmente, para testes de eficácia, *in vitro* e *in vivo*, de formulações e extratos vegetais com potencial leishmanicida.

O tratamento ainda constitui a principal forma de controle das leishmanioses, entretanto, o arsenal quimioterapêutico para esse controle é pequeno. Com o aumento da incidência de parasitos resistentes aos medicamentos nas áreas endêmicas, a elevada toxicidade dos fármacos de primeira escolha e as desconfortáveis vias de administração

para os pacientes, se faz necessário o aprimoramento de técnicas de tratamento da doença (Farault-Gambarelli et al. 1997; Rojas et al. 2006; Sundar et al. 2001).

O elevado custo do tratamento é outro fator a ressaltar, por serem os medicamentos importados e pela eventual necessidade de cuidados médicos relacionados a administração do fármaco e aos efeitos colaterais (Ministério da Saúde, 2006). Tendo em vista essas dificuldades, pesquisas estão sendo realizadas com a finalidade de elaborar novas formulações que auxiliem no avanço dos tratamentos já empregados.

O uso de lipossomas para o tratamento da LV já vem sendo estudado desde 1977-1978, onde foi relatado pela primeira vez que encapsulados em lipossomas, os antimoniais pentavalentes eram de 200 a 700 vezes mais eficazes que na forma livre, quando testados em modelos experimentais (Frezárd et al. 2005).

Apesar dos excelentes resultados, até hoje, nenhuma composição farmacêutica associando lipossomas com antimoniais chegou a ser comercializada. Tal dificuldade pode ser atribuída às dificuldades tecnológicas inerentes à obtenção de formulação estável de compostos hidrossolúveis, como os antimoniais, encapsulados em lipossomas (Frezárd et al. 2005).

Em vista disto, modificações na composição dos lipossomas a fim de se conseguir estruturas mais estáveis e associações com diferentes fármacos no tratamento da LV já foram relatadas (Frézard et al. 2000; Frézard et al. 2004; Frézard et al. 2005; Schettini et al. 2005; Schettini et al. 2006; Ribeiro et al. 2008; da Silva et al. 2012).

Em recente estudo, autores demonstraram que tanto a redução do diâmetro das vesículas quanto a incorporação de um lipídio peguilado em formulação de AM encapsulado em lipossomas, contribuíram para prolongamento do tempo de circulação do fármaco na corrente sanguínea, melhor direcionamento para os órgãos alvo, como a medula óssea, além de maior eficácia terapêutica, em modelo murino de LV (Azevedo et al. 2014).

A modificação química da superfície das vesículas dos lipossomas, com a incorporação do PEG, proporciona: redução do nível de opsonização dos lipossomas; redução da velocidade de captação pelos macrófagos dos órgãos do sistema fagocítico mononuclear (fígado, baço, medula óssea); circulação prolongada no plasma sanguíneo;

acúmulo preferencial em sítios de inflamação/infecção pelo fato destes sítios apresentarem uma permeabilidade vascular aumentada (Frézard et al. 2005).

A miltefosina é uma alquifosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer. O fármaco vem sendo utilizado na Índia para o tratamento de pacientes com LV refratária ao tratamento convencional com antimoniais, apresentando resultados bastante promissores. Atualmente desponta como a melhor alternativa para o tratamento da LV, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral (Croft et al. 2006; Sundar et al. 2006; Bhattacharya et al. 2007).

A ação da miltefosina em espécies de *Leishmania* vem sendo estudada há aproximadamente 30 anos (Croft, 1987) e já se mostrou efetiva contra formas amastigotas e promastigotas de espécies envolvidas na LV (Sundar et al. 1998; Jha et al. 1999; Murray & Delph Etiene, 2000; Paris et al. 2004). Atualmente, a miltefosina é aprovada para o uso contra a LV na Índia (2002), Alemanha (2004) e Colômbia (2005) (Sundar et al. 2006; WHO, 2010).

A miltefosina apresenta efeitos adversos quando administrada oralmente, como nefrotoxicidade, teratogenicidade e distúrbios gastrintestinais como vômitos e diarreias, impedindo a absorção do medicamento (Sundar et al., 2002; Bhattacharya et al., 2007; Soto & Toledo, 2007). Além disso, sua prolongada meia-vida favorece a seleção de parasitos resistentes, como já demonstrado em estudo de fase IV na Índia (Sundar & Chatterjee, 2006 Bhattacharya et al., 2007). A administração da miltefosina por via endovenosa e em formulação lipossomal a deixariam menos tóxica e garantiria que toda droga fosse administrada/absorvida, com menos efeitos colaterais e menor chance de desenvolver resistência.

Até onde vai nosso conhecimento não há relatos na literatura sobre a eficácia e toxicidade de formulações lipossomais peguiladas de miltefosina. Também não há relatos do preparo, caracterização e eficácia de formulação lipossomal peguilada contendo dois fármacos leishmanicidas (miltefosina e AM).

Os promissores resultados obtidos nesse trabalho mostraram que as formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM apresentaram tamanho reduzido, monodispersão e estabilidade elétrica, características fundamentais do ponto de vista farmacêutico, além de significativa eficácia leishmanicida.

Um aspecto considerado importante no preparo da formulação foram as extrusões em membrana de policarbonato antes e depois da liofilização, conferindo uniformidade no tamanho hidrodinâmico das vesículas (Frézard et al., 2005; Azevedo et al., 2014). Ambas as formulações apresentaram diâmetro hidrodinâmico médico inferior a 200nm característica fundamental para garantir direcionamento aos órgãos alvo. Por outro lado, esta característica não foi observada quando do uso de açúcar como criopreservante para as formulações peguiladas (dados não mostrados).

Além disso, o potencial zeta, definido como o potencial elétrico cinético em sistemas coloidais, foi considerado estável nestas formulações. Gregoriadis (2007), sugere que sistemas coloidais com potencial zeta maiores que +30mV ou -30mV são considerados eletricamente estáveis. Nossas formulações, HePC-PEG e HePC-PEG/AM apresentaram, em média, potencial zeta -63,5mV e -64,6mV, respectivamente.

Outro resultado importante das nossas formulações foi o índice de polidispersão, que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das vesículas. Para todas as formulações o índice de polidispersão foi baixo (< 0,3) indicando a formação de sistemas monodispersos.

A metodologia empregada para o preparo das formulações peguiladas de HePC e AM proporcionou reproduzibilidade e constância das principais características: homogeneidade no tamanho, monodispersão e estabilidade elétrica das vesículas. Esta reproduzibilidade e constância no preparo é fundamental do ponto de vista farmacotécnico, para a produção em escala de um produto farmacêutico.

A eficiência de encapsulação de Sb pode variar dependendo da composição da vesícula lipídica, do diâmetro do lipossoma e de acordo com o método de preparação dessas (Monnard et al. 1997). Segundo Frézard & Demicheli (2011), a eficiência de encapsulação de Sb pode variar de 8 a 50%. Nossos lipossomas corroboram com esses dados, pois apresentaram taxa de encapsulação média de 25% para HePC-PEG/AM e 22,5% para LAM. Uma vantagem esperada da formulação de HePC-PEG/AM sobre a LAM seria, além de maior tempo de circulação, o efeito aditivo e/ou sinérgico dos dois fármacos.

Para preparação da formulação LAM utilizou-se sacarose para obtenção de lipossomas de tamanho reduzido. A sacarose também influencia na velocidade de liberação de Sb para meio aquoso tornando-a mais acelerada. Esse fato explica a menor

liberação de Sb da formulação HePC-PEG/AM em relação a LAM nas primeiras 24h. A maior liberação ocorre pelo aumento da pressão osmótica do meio interno dos lipossomas, devido à co-encapsulação da sacarose (Frezard et al. 2005). A partir dos resultados obtidos com a metodologia de preparo das formulações peguiladas, foi testado, com bons resultados, o uso das extrusões ao invés da adição de criopreservante para no preparo das formulações de LAM. A partir dos resultados, esta metodologia tem sido adotada na rotina do LabNano para o preparo do LAM (dados não mostrados).

Para detecção de HePC nas formulações foi realizado o ensaio de cromatografia em camada delgada. As manchas observadas em ambas as formulações, HePC-PEG e HePC-PEG/AM, foi constante para todos os lotes produzidos. Vale ressaltar que não foi evidenciada a presença de HePC livre na fase aquosa da suspensão, resultado importante, pois sugere que toda miltefosina foi incorporada a membrana da vesícula lipossomal e está disponível na formulação. Tanto HePC quanto DPPC apresentaram Rf muito semelhantes, não permitindo a visualização separadamente no perfil cromatográfico das formulações. Ensaios futuros utilizando CLAE acoplado a um espectrômetro de massas (Dorlo et al. 2008), ou cromatografia camada delgada de alta eficiência (HPLC) para quantificar HePC nas formulações e em testes de biodistribuição (Kaufmann-Kolle et al. 1994).

Kuhlencord e colaboradores (1992) fizeram teste de eficácia de miltefosina no tratamento de camundongos BALC/c infectados com *Leishmania donovani* e *Leishmania infatum*. Eles usaram dosagem de 10 – 20mg/kg de miltefosina por dia, por 5 dias. Para o nosso ensaio piloto de toxicidade, *in vivo*, da miltefosina em formulações lipossomais peguiladas, utilizamos dosagem de 40mg/kg de miltefosina, ou seja, 2-4 vezes mais. Nossos resultados corroboram com Dorlo e colaboradores (2012), pois sugerem uma toxicidade hepática aguda e transitória onde os níveis séricos das transaminases estabilizam a partir de 24h após a aplicação da miltefosina.

Acreditamos que a toxicidade aguda das formulações será reduzida após a determinação do protocolo terapêutico que utilizaremos em modelo murino de LV. Primeiro porque as formulações induziram toxicidade transitória igual, ou menos intensa que a miltefosina livre (como no caso da TGO), em doses 2-4 vezes maiores que as terapêuticas. Segundo, porque uma das maiores vantagens de drogas em sistemas lipossomais peguilados é o benefício da circulação prolongada, possibilitando uso de

doses efetivas menores que as convencionais e/ou posologia com intervalos de tempo maiores entre as aplicações.

Para determinar o CI_{50} das nossas formulações, utilizamos o ensaio colorimétrico de redução da rezazurina. A rezazurina é um corante solúvel em água, estável e não tóxico para as células. O "teste de redução rezazurina" tem sido usado por cerca de 50 anos para monitorar a contaminação por bactérias e leveduras em leite, e também para avaliar a qualidade do sêmen. Resazurina é um sal azul e não fluorescente que é reduzido para resorufina, rosa e altamente fluorescente. Ainda não se sabe ao certo como esta redução ocorre, entretanto, acredita-se que provavelmente seja através de atividade enzimática intracelular, ou no meio devido a uma reação química (O'Brien et al., 2000). O ensaio tem sido amplamente utilizado em *Leishmania*, por ser uma maneira simples e versátil de mensurar a proliferação celular e citotoxicidade frente aos mais diversos compostos químicos (Corral et al. 2013).

Nossos resultados sugerem que a miltefosina em formulação lipossomal peguilada contendo ou não AM encapsulado não apresentou redução na sua atividade leishmanicida, uma vez que os valores de CI_{50} para estas formulações foram semelhantes ao obtido para a miltefosina livre.

As formulações HePC-PEG e HePC-PEG/AM apresentaram CC_{50} maiores que a miltefosina, sugerindo que em formulação lipossomal, a miltefosina diminui sua toxicidade para macrófagos murinos. A redução da toxicidade pode dar mais opções de uso terapêutico para os fármacos, podendo, por exemplo, o mesmo ser utilizado em doses maiores que as do medicamento livre sem causar incremento nos efeitos colaterais.

Entretanto, o maior ganho do ponto de vista terapêutico seria a utilização do fármaco em doses menores com o mesmo efeito leishmanicida, com redução dos efeitos colaterais e diminuição da possibilidade de seleção de parasitos resistentes ao fármaco em questão (Silva et al. 2012; Frezard et al. 2012). Acreditamos que este ganho em eficácia poderá ser incrementado pela incorporação do PEG na formulação, que permitiria circulação mais prolongada, e alcance a sítios de acesso mais difícil, como a pele e medula óssea, já demonstrado em modelo murino pelo nosso grupo, com AM em formulação peguilada (Azevedo et al. 2014). O uso da miltefosina em formulação lipossomal de circulação prolongada pode permitir um maior intervalo entre as aplicações, sem perda de sua eficácia terapêutica. Estudos de biodistribuição e

farmacocinética devem ser conduzidos para verificar o intervalo ideal e dose eficaz das formulações para o tratamento da LV.

Nos ensaios de eficácia contra amastigotas intracelulares, as formulações peguiladas foram utilizadas na concentração de 10 μ M, tomando como base os valores médios de CC₅₀ (41,5 μ g/mL) obtidos para a miltefosina nos testes de citotoxicidade.

Nossos resultados corroboram os de Moraes-Teixeira e colaboradores (2011) que obtiveram CC₅₀ igual a 37,8 μ g/mL. No nosso estudo usamos um IT = 10 para as formulações peguiladas, com o objetivo de alcançar o máximo de efeito terapêutico utilizando a mínima concentração de fármaco. De acordo com Weninger e colaboradores (2001), valores de IT iguais ou maiores que 10 são sugestivos de eficácia biológica e com ação seletiva do fármaco/substância para *Leishmania*.

Moraes-Teixeira e colaboradores (2011) testando miltefosina na infecção por amastigotas de *L. infantum* cepa BH46 em macrófagos peritoneais obtiveram valores de CI₉₀ de 12,39 μ M (5,05 μ g/mL). Em razão disso acreditamos que a concentração de miltefosina utilizada (4,07 μ g/mL) nos testes não foi suficiente para eliminar por completo a infecção nos tempos avaliados. Os dados obtidos de CC₅₀ nos permitem propor novos testes de eficácia *in vitro* utilizando concentrações mais elevadas da miltefosina lipossomal peguilada, com o objetivo de determinar a concentração ideal em que há eliminação por completo da infecção, sem aumento significativo da sua toxicidade celular.

HePC-PEG e HePC-PEG/AM foram capazes de reduzir de forma significativa as taxas de infecção de macrófagos em relação ao controle em todos os tempos avaliados. Além do controle, as taxas de infecção obtidas pelas formulações peguiladas foram significativamente menores que os obtidos pelo AM, LAM e Lemp, e menores (não significativo) que as obtidas pela miltefosina livre no tempo de 72h.

Esta redução significativa pode ser devido à lenta liberação da miltefosina da estrutura da vesícula lipossomal. Ao contrário do AM que está encapsulado do interior da vesícula, a miltefosina faz parte dos constituintes da parede do lipossoma. Esse resultado pode ser ainda melhor no modelo *in vivo*, pois vai de encontro com a hipótese de circulação prolongada e liberação lenta do fármaco.

Pela primeira vez, formulações lipossomais peguiladas contendo miltefosina e contendo miltefosina e AM foram preparadas e caracterizadas. Além de uniformidade e

reprodutibilidade das características principais, essas formulações foram eficazes para o tratamento de LV experimental, *in vitro*. Acreditamos que este trabalho pioneiro irá fornecer subsídios para a condução de testes de farmacocinética, biodistribuição e eficácia terapêutica, *in vivo*, em modelos de LV como hamsters, cães e primatas não-humanos.

8. Conclusões

- A rotina de cultivo e manutenção de *Leishmania infantum* cepa MHOM/BR/1967/BH46 foi estabelecida no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do ICBIM-UFU.
- A formulação lipossomal de circulação prolongada contendo miltefosina (HePC-PEG) foi preparada e caracterizada. Apresentou-se estável eletricamente (Potencial Zeta= -63,5mV), monodispersa (Índice de Polidispersão = 0,079), com diâmetro hidrodinâmico médio igual a 171,9 nm, e sem perda da miltefosina das vesículas lipossomais para a fase aquosa da suspensão.
- A formulação lipossomal de circulação prolongada contendo miltefosina e antimoniato de meglumina encapsulado (HePC-PEG/AM) foi preparada e caracterizada. Apresentou-se estável eletricamente (Potencial Zeta = -64,6mV), monodispersa (IP = 0,053), com diâmetro hidrodinâmico médio igual a 166,4 nm e taxa de encapsulação de Sb igual a 25%, e sem perda da miltefosina das vesículas lipossomais para a fase aquosa da suspensão.
- A formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais (LMA) foi preparada e caracterizada. Apresentou-se estável eletricamente (Potencial Zeta = -69,7mV), monodispersa (IP=0,154) e com diâmetro hidrodinâmico médio igual a 172,9 nm, e taxa de encapsulação média de Sb igual a 22,5%.
- HePC-PEG e HePC-PEG/AM apresentaram valores de CC₅₀, *in vitro*, após exposição por 72h a macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C, iguais a 92,49 μ g/mL e 103,09 μ g/mL, respectivamente, ambos maiores que o valor obtido para miltefosina livre (41,59 μ g/mL)
- HePC-PEG e HePC-PEG/AM apresentaram valores de CI₅₀, *in vitro*, após exposição por 72h a promastigotas de *Leishmania infantum*, de 33,19 μ g/mL e 33,05 μ g/mL, respectivamente, enquanto para miltefosina livre o CI₅₀ foi de 49,59 μ g/mL.
- HePC-PEG e HePC-PEG/AM apresentaram redução significativa das taxas de infecção dos macrófagos por *Leishmania infantum* após 24h, 48h e 72h de exposição, em relação ao grupo controle. Além da redução significativa na carga parasitária, as formulações não induziram alteração na morfologia dos macrófagos.

- HePC-PEG e HePC-PEG/AM apresentaram redução significativa das taxas de infecção dos macrófagos por *Leishmania infantum* após 72h de exposição, em relação aos grupos controle, e tratados com antimoniato de meglumina, antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais e lipossomas convencionais vazios.

REFERÊNCIAS

ALLEN, T.M., HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. **Biochim Biophys Acta**, v.1068(2), p.133-41, 1991 [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90201-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90201-1)

ALVAR, J., YACTAYO S., BERN C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitology**, v.22, p. 552-557, 2006 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>

ALVES, W.A., BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Cad Saude Publica**, v.20, p. 259-265, 2004 <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000100043>

ARTAN, R., YILMAZ, A., AKÇAM, M., AKSOY, N.H. Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal Gastroenterol Hepatol**, v.21, (1Pt 2) p.299-302, 2006 <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04172.x>

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Dermatol**, v.14, n.5, p.523-532, 1996 [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7)

ASHFORD, R.W. The leishmanias as emerging and reemerging zoonoses. **Int Journal Parasitol**, v.30, n.12-13, p.1269-1281, 2000 [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00136-3)

AZEVEDO, E.G., RIBEIRO, R.R., DA SILVA, S.M., FERREIRA, C.S. et al. Mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opinion Drug Delivery** 11(10):1551-60, 2014 <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.932347>

BATES, P.A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal Parasitology**, v.37(10), p.1097-1106, 2007 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BATES, P.A. Leishmanias and fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion Microbiology**, v.11, p.340-344, 2008 <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.003>

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Disease**, v.24, p.684-703, 1997 <https://doi.org/10.1093/clind/24.4.684>

BHATTACHARYA, S.K., SINHA, P.K., SUNDAR, S., THAKUR, C.P., JHA, T.K., PANDEY, K., DAS, V.R., KUMAR, N., LAL, C., VERMA, N., SINGH, V.P., RANJAN, A., VERMA, R.B., ANDERS, G., SINDELMANN, H., GANGULY, N.K. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.196(4), p.591-8, 2007 <https://doi.org/10.1086/519690>

CASTELLANO, R.L. Resposta immune anti-Leishmania e mecanismos de evasão. Vitae Academia Biomédica Digital, n.25, 2005

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? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.873-882, 2007
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>

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(2), p.111-6, 2013 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.05.012>

COSTA, C.H. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Publica**, v.24, p. 2959-2963, 2008
<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200027>

COSTA, CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p. 232-242, 2011 <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000014>

CROFT, S.L. In vitro screens in the experimental chemotherapy of Leishmaniasis and trypanosomiasis. **Parasitol Today**, v.2, p. 64-9, 1986 [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(86\)90157-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(86)90157-2)

CROFT, S.L., BARRETT, M.P., URBINA, J.A. Chemotherapy of trypanosomiases and leishmaniasis. **Trends Parasitol**, v.21(11), p.508-12, 2005
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.026>

CROFT, S.L., ENGEL, J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 100 Suppl 1:S4-8, 2006
<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.03.009>

BARRETT, M.P., URBINA, J.A. Chemotherapy of trypanosomiases and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v.21(11), p.508-12, 2005
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.026>

DANTAS-TORRES, F. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as transmissionblocking vaccine. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.1-8, 2006 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.001>

DEMICHELI, C., OCHOA, R., SILVA LULA, I., GOZZO, F.C., EBERLIN, M.N., FREZARD, F. Pentavalentorganoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumineantimonate. **App Organ Chem**, v.17, p. 226-231, 2003 <https://doi.org/10.1002/aoc.425>

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infection Diseases**, v.27, p. 305-318, 2004
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

DORLO, T.P.C., HILLEBRAND, M.J.X. ROSING, H et al. Development and validation of a quantitative assay for the measurement of miltefosine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Bio med Life Sci**, v.865, p. 55–62, 2008
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.02.005>

DORLO, T.P., BALASEGARAM, M., BEIJNEN, J.H., DE VRIES, P.J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal Antimicrob Chemother**, v.67(11), p.2576-97, 2012
<https://doi.org/10.1093/jac/dks275>

ESLAMI, 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(5), p.743-7, 1994 [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90130-9)

FARAUT-GAMBARELLI, F., PIARROUX, R., DENIAU, M., GIUSIANO, B., MARTY, P., MICHEL, G., FAUGÈRE, B., DUMON, H. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41(4), p. 827-30, 1997

FRÉZARD F, MICHALICK MS, SOARES CF, DEMICHELI C. Novel methods for the encapsulation of meglumineantimoniate into liposomes. **Braz J MedBiol Res**, v.33, p. 841-846, 2000 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000700016>

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., SCHETTINI, D.A., RIBEIRO, R.R., MELO, M.N., MICHALICK, M.S.M. Processo para a preparação de formulações farmacêuticas do antimoniato de meglumina em lipossomas e uso das formulações farmacêuticas em animais acometidos com leishmaniose visceral. Depósito de patente no INPI PI0405489-0, 11 de novembro de 2004

FRÉZARD, F, SCHETTINI, D. A, ROCHA, O. G. F., DEMICHELI. C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, No. 3, p. 511-518, 2005 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300025>

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opinion Drug Delivery**, v.7(12), p.1343-58, 2010 <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.529897>

FRÉZARD, F.; AZEVEDO, E.G.; RIBEIRO, R.R.; DA 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, 2012

GOODWIN, L.G., PAGE, J.E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem J**, v.37(2), p.198-209, 1943 <https://doi.org/10.1042/bj0370198>

GRAMICCIA M, GRADONI L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal of Parasitology**. 35, 1169-1180, 2005 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001>

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

GRIEWANK K, GAZEAU C, EICHHORN A, VON STEBUT E. Miltefosine efficiently eliminates *Leishmania* major amastigotes from infected murine dendritic cells without altering their immune functions. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 54(2), p.652-9, 2010 <https://doi.org/10.1128/AAC.01014-09>

JHA, T.K., SUNDAR, S., TAKUR, C.P. et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 24, p. 1795-18000, 1999 <https://doi.org/10.1056/NEJM199912093412403>

KAR, K, MUKERJI K, NASKAR K, BHATTACHARYA A, GHOSH DK. *Leishmania donovani*: a chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to promastigotes. **J Protozool**. v.37 (4), p.277-9, 1990 <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1990.tb01147.x>

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(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(1), p.235-7, 1990

KUHLENCORD, A., MANIERA, T., EIBL, H., UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.36(8), p.1630-4, 1992 <https://doi.org/10.1128/AAC.36.8.1630>

LAINSON, R., SHAW, J.J. The leishmaniasis in biology and medicine, In, pp. 291-364, 1987

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 <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>

LAINSON, R., SHAW, J.J. NEW WORLD LEISHMANIASIS. IN. COX FEG, WAKELIN D, GILLESPIE SH, DESPOMMIER DD. Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Parasitology, 10th ed., ASM Press, London, p. 313-349, 2005

MACHADO, C.M., MARTINS, T.C., COLTURATO, I., LEITE, M.S., SIMIONE, A.J., SOUZA, M.P., MAUAD, M.A., COLTURATO, V.R. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a brazilian hsct center. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v.51 n.6, p.309-24, 2009 <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000600002>

MAIA-ELKHOURY, A.N., ALVES, W.A., SOUSA-GOMES, M.L., SENA, J.M., LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno Saúde Pública**, v.24, p. 2941-2947, 2008 <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200024>

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 <https://doi.org/10.1017/S0031182001007466>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1^a Ed. Brasília, Ministério da Saúde, 122 p., 2006MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011 - http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012 - <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014 - <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods** v.65(1-2), p.55-63, 1983 [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MONNARD, P.A., OBERHOLZER, T., LUISI, P. Entrapment of nucleic acids in liposomes. **Biochim Biophys Acta**, v 2, p.39-50, 1997 [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00066-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00066-7)

MORAIS-TEIXEIRA, E., DAMASCENO, Q.S., GALUPPO, M.K., ROMANHA, A.J. et al. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant Leishmania species of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [online], v.106, n.4, 2011 <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400015>

MURRAY, H.W., DELPH-ETIENNE, S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbial mechanisms. **J Infect Dis**, v. 181(2), p.795-9, 2000 <https://doi.org/10.1086/315268>

MURRAY, H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and futures approaches. **International Journal of Infection Diseases**, v.4, n.3, p.158-177, 2004 [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(00\)90078-X](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(00)90078-X)

O'BRIEN, J., WILSON, I., ORTON, T., POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal Biochem**, v. 267(17), p. 5421-6, 2000 <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

PAPAGIANNAROS, A., BORIES, C., DEMETZOS, C., LOISEAU, P.M. Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. **Biomed Pharmacother** 59(10):545-50, 2005 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.06.011>

PARIS, C., LOISEAU, P.M., BORIES, C., BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48(3), p.852-9, 2004 <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.852-859.2004>

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(5891), p.970-4, 2008 <https://doi.org/10.1126/science.1159194>

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(5065), p.1812-1815, 1992
<https://doi.org/10.1126/science.1615326>

RAHMAN SB, BARI UA, MUMTAZ N. Miltefosine in cutaneous leishmaniasis. **Journal of the College of Physicians and Surgeons – Pakistan**, v.17, n.3, p.132-135, 2007

RAKOTOMANGA, M., BLANC, S., GAUDIN, K., CHAMINADE, P., LOISEAU, P.M. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.51(4), p.1425-30, 2007
<https://doi.org/10.1128/AAC.01123-06>

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 Radiol**, v.78, p. 158-160, 2005 RIBEIRO, R.R., MOURA, E.P., PIMENTEL, V.M., SAMPAIO, W.M., et al. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 2564-2572, 2008

ROMERO GA, BOELAERT M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis** 4: e584, 2010
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>

ROSS, R. Further note on leishmania´s bodies. **British Medical Journal**, v. 11, p. 1401, 1903 <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2239.1401>

ROJAS, R., VALDERRAMA, L., VALDERRAMA, M., VARONA, M.X., OUELLETTE, M., SARAVIA, N.G. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. **J Infect Dis**, v.193(10),p.1375-83, 2006 <https://doi.org/10.1086/503371>

SACKS, D., KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol** 55: 453-483, 2001
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.453>

SACKS, D., SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunol**, v.3, p.1041-1047, 2002 <https://doi.org/10.1038/ni1102-1041>

SALIBA, E.K., OUMEISH, Y.O. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol**, v.17, p.275-277, 1999 [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00045-0)

SCHETTINI, D.A, COSTA VAL, A.P., SOUZA, L.F., DEMICHELI, C., ROCHA, O.G.F, MELO, M.N., MICHALICK, M.S.M, FRÉZARD, F. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumineantimoniate. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p. 1879-83, 2005
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005001200017>

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. **Int J Pharm**, v. 315, p. 140-147, 2006
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.048>

SEIFERD, K., CROFT, L. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** **50**: 73-79, 2006
<https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.73-79.2006>

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. **Antimicrob Agents Chemother**, v56(6), p. 2858-67, 2012

SILVEIRA FT, LAINSON R, et al. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.99(3), p. 239-251, 2004
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300001>

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 Toxins including Diseases**, v. 11, n.4, p.579-593, 2005

SOTO, J., TOLEDO, J.T. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v.7(1), p.7, 2007

SUNDAR, S., PAI, K., KUMAR, R., PATHAK-TRIPATHI, K., GAM, A.A., RAY, M., KENNEY, R.T. Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. **Am J Trop Med Hyg**, v.65(3), p.193-6, 2001
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.193>

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(9143), p.1821-3, 1998 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04367-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04367-0)

SUNDAR, S., JHA, T.K., THAKUR, C.P., ENGEL, J., SINDERMANN, H., FISCHER, C., JUNGE, K., BRYCESON, A., BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v.347(22), p.1739-46, 2002
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa021556>

SUNDAR, S., CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J Med Res**, v.123(3), p.345-52, 2006

TEMPONE, A.G., PEREZ, D., RATH, S., VILARINHO, A.L., MORTARA, R.A., DE ANDRADE, H.F.JR. Targeting Leishmania (L.) chagasi amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal Antimicrob Chemother**, v.54(1), p.60-8, 2004
<https://doi.org/10.1093/jac/dkh281>

TYAGI, N., GHOSH, P.C. Folate receptor mediated targeted delivery of ricin entrapped into sterically stabilized liposomes to human epidermoid carcinoma (KB) cells: effect of

monensin intercalated into folate-tagged liposomes. **Eur J Pharm Sci**, v.43(4), p.343-53, 2011 <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.05.010>

VERMA, N.K., DEY, C.S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.8, p. 3010-3015, 2004 <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004>

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

WENINGER, B., ROBLEDO, S., ARANGO, G.J., DEHARO, E., ARANGO, R., MUÑOZ, V., CALLAPA, J., LOBSTEIN, A., ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J Ethnopharmacol** v.78, p. 193-200, 2001 [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00346-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00346-4)

WOODLE, M.C., LASIC, D.D. Sterically stabilized liposomes. **Biochim Biophys Acta** v. 1113(2), p. 171-99, 1992 [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(92\)90038-C](https://doi.org/10.1016/0304-4157(92)90038-C)

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

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



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