

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Karen Ferraz Faria

FORMULAÇÃO DE ANFOTERICINA B EM LIPOSSOMAS DE CIRCULAÇÃO  
PROLONGADA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Uberlândia,  
Fevereiro-2020

Karen Ferraz Faria

FORMULAÇÃO DE ANFOTERICINA B EM LIPOSSOMAS DE CIRCULAÇÃO  
PROLONGADA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

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

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

**Coorientador:** Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard (ICB/UFMG)

Uberlândia,  
Fevereiro-2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F224 Faria, Karen Ferraz, 1991-  
2020 FORMULAÇÃO DE ANFOTERICINA B EM LIPOSSOMAS DE  
CIRCULAÇÃO PROLONGADA PARA O TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL [recurso eletrônico] / Karen Ferraz Faria.  
- 2020.

Orientador: Sydnei Magno da Silva.

Coorientador: Frédéric Jean Georges Frezard.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-  
graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.117>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Silva, Sydnei Magno da, 1976-, (Orient.). II.  
Frezard, Frédéric Jean Georges, 1964-, (Coorient.). III.  
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia  
e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada  
Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 128 do PPIPA				
Data:	vinte e sete de fevereiro de dois mil e vinte	Hora de início:	14:08 hs.	Hora de encerramento:	17:49 hs.
Matrícula do Discente:	11613IPA005				
Nome do Discente:	Karen Ferraz Faria				
Título do Trabalho:	Formulação de Anfotericina B em Lipossomas de Circulação Prolongada para o Tratamento da Leishmaniose Visceral				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biotecnologia empregada no diagnóstico e controle de doenças				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Formulações nanoestruturadas contendo fármacos leishmanicidas e produtos naturais para o tratamento das leishmanioses				

Reuniu-se no bloco 2B Sala 2B216 Campus Umarama, da Universidade Federal de Uberlândia, presencialmente e por WebConf da RNP, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos Membros Titulares: Prof. Dr. Raul Rio Ribeiro - UFJF - (WebConf), Dra. Ceres Luciana Alves - UFMG - (WebConf), Dra. Juliana Silva Miranda - ICBIM/UFU - (Presencial), Dra. Vanessa da Silva Ribeiro - ICBIM/UFU - (Presencial), Prof. Dr. José Roberto Mineo - ICBIM/UFU - (Presencial), orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Sr. José Roberto Mineo, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a disponibilidade dos membros da banca, a presença do público presente, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e respostas foram realizadas conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) 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 o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Raul Rio Ribeiro, Usuário Externo**, em 27/02/2020, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ceres Luciana Alves, Usuário Externo**, em 27/02/2020, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa da Silva Ribeiro, Biólogo(a)**, em 27/02/2020, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Silva Miranda, Técnico(a) de Laboratório**, em 27/02/2020, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/02/2020, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1863863** e o código CRC **4041AEA8**.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de executar esse trabalho, por ser minha força e minha proteção.

Ao meu esposo, por seu amor, apoio incondicional e paciência. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais, por investirem em meu sonho e estudo. Agradeço pelo apoio e amor incondicional presentes durante toda minha vida.

À minha irmã Hellen, minha avó Sirley e minha sobrinha Ana Júlia, por seu amor e por sempre torcerem por mim.

As minhas prezadas amigas Thádia, Talita, Cândida e Natália, pelo constante apoio e amizade.

Aos colegas de laboratório Iasmin e Marco, obrigada por sempre me auxiliarem, por serem sempre prestativos, vocês foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva, obrigada pela orientação e atenção durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, paciência e dedicação no decorrer da elaboração da tese. A ele, minha admiração, por ser um exemplo de profissionalismo.

À técnica do Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos, Dr. Juliana da Silva Miranda, que sempre esteve disposta a me auxiliar em todos os momentos durante o desenvolvimento do trabalho. Obrigada pela sua dedicação e ensinamentos.

À Dr. Renata Cristina de Paula, pela amizade, apoio e ensinamento que foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard e ao Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados da Universidade Federal de Minas Gerais, pela produção e caracterização dos lipossomas utilizados neste trabalho.

Ao Prof. José Roberto Mineo, por toda ajuda e apoio que foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Wagner Luiz Tafuri e ao Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela parceria na análise bioquímica das amostras utilizadas.

Aos membros da banca, pela cordialidade, de terem aceitado participar da discussão da minha tese.

À CAPES pelo apoio financeiro, permitindo o desenvolvimento desse estudo.

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária grave, causada por *Leishmania infantum* e *L. donovani*. Estima-se que cerca de 300.000 novos casos resultem em ~30.000 mortes/ano em todo o mundo. O tratamento é a principal medida de controle, mas possui limitações, como toxicidade e linhas de alto custo. O objetivo desse estudo foi preparar, caracterizar e avaliar a eficácia terapêutica, *in vitro* e *in vivo*, de uma inovadora formulação lipossomal de circulação prolongada contendo AmB (LAmB-PEG), e de uma formulação lipossomal convencional (LAmB-Conv) para o tratamento da LV. Os lipossomas foram preparados pelo método de "Desidratação e reidratação das vesículas" e a média de diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta (Z) e o índice de polidispersão (IP) das vesículas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons. O ensaio de citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) foi realizado na linhagem celular RAW 264.7 pelo método colorimétrico MTT. Os valores da concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) foram determinados pelo ensaio colorimétrico da resazurina nas cepas *Leishmania (L.) infantum* (MCAN/BR/2002/BH401). Em seguida, foi calculado o índice de seletividade (SI), estabelecido pela razão CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>. Camundongos BALB/c foram tratados de acordo com os seguintes protocolos (n=6): i- duas doses de LAmB-PEG (5mg/kg/96h/IP); ii- duas doses de LAmB-Conv (5mg/kg/96h/IP); iii- dez doses de AmB (5mg/kg/24h/IP); iv- 36 animais que não receberam nenhum tratamento. Após o tratamento, o sangue foi coletado e alíquotas de plasma foi utilizada para avaliar as funções renais (níveis séricos de uréia e creatinina) e hepáticas (níveis de transaminase pirúvica, transaminase oxaloacética, proteínas séricas totais e albumina). Camundongos BALB/c foram infectados com 10<sup>7</sup> promastigotas de *L. infantum* (MCAN/BR/2002/BH401) e vinte e cinco dias após a infecção, os animais foram tratados com dois protocolos terapêuticos (n=6): Protocolo 1: i- duas doses de LAmB-PEG (5mg/kg/96h/IP); ii- duas doses de LAmB-Conv (5mg/kg/96h/IP); iii- dez doses de AmB (5mg/kg/24h/IP); iv- dez doses de solução salina estéril (PBS) (24h). Protocolo 2: i- duas doses de LAmB-PEG (10mg/kg/96h/IP); ii- duas doses de LAmB-Conv (10mg/kg/96h/IP); iii- dez doses de AmB (5mg/kg/24h/IP); iv- dez doses de PBS (24h). Após o tratamento, os animais foram sacrificados e a carga parasitária no fígado e baço foi determinada pelo qPCR. As formulações preparadas nesse trabalho apresentaram características de nanosistemas estáveis, monodispersos com diâmetro hidrodinâmico médio inferior a 200nm. LAmB-PEG apresentou CC<sub>50</sub>, igual a 328,55µg/mL e LAmB-Conv igual a 316,1µg/mL, ambas taxas maiores que a AmB livre (265,61µg/mL), sugerindo menor toxicidade celular da droga em formulação lipossomal. Os valores de CI<sub>50</sub>, foram

semelhantes para LAmB-PEG (20,365 ng/mL), LAmB-Conv (25,215ng/mL) e para AmB livre (38,305 ng/mL), sugerindo que não houve redução da atividade leishmanicida da AmB nas formulações. Contra amastigotas intracelulares, a LAmB-PEG reduziu significativamente as taxas de infecção dos macrófagos em relação ao controle (macrófagos sem tratamento), e macrófagos tratados com LAmB-Conv e AmB-D. Não houve alteração da função renal nos ensaios de toxicidade e eficácia terapêutica realizados em modelo murino. No entanto, as enzimas TGO e albumina, utilizadas para avaliar a função hepática, estavam aumentadas nos grupos tratados com LAmB-PEG, LAmB-Conv e AmB-D. Os demais parâmetros para avaliar a função hepática estavam dentro dos níveis de referência para as formulações. Os animais infectados com *L. infantum* e tratados com a formulação LAmB-PEG apresentaram redução significativa da carga parasitária no fígado e baço em relação ao grupo controle, nos protocolos terapêuticos avaliados (5mg/kg e 10mg/kg). Na dose de 10 mg/kg, no baço, a formulação LAmB-PEG apresentou diferença estatística com a AmB, indicando uma melhora na eficácia do fármaco ao ser encapsulado em vesícula lipossomal. Pela primeira vez a prova de conceito de que as formulações inovadoras de LAmB-PEG e LAmB-Conv induzem significativa redução das taxas de infecção de *L. infantum*, *in vitro* e *in vivo*, foi confirmada. Estes resultados reforçam o potencial terapêutico destas formulações e abrem novas perspectivas para o tratamento da LV.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose visceral, tratamento, anfotericina B, lipossomas, lipossomas de circulação prolongada.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious parasitic disease, caused by *Leishmania (L.) infantum* and *L. (L.) donovani*. It is estimated that around 300,000 new cases result in ~30,000 deaths/year worldwide. Treatment is the main control measure, but it has limitations, such as toxicity and high cost lines. The objective of this study was to prepare, characterize and evaluate the therapeutic efficacy, in vitro and in vivo, of an innovative prolonged circulation liposomal formulation containing AmB (LAmB-PEG), and of a conventional liposomal formulation (LAmB-Conv) for the treatment of LV. The liposomes were prepared using the "Vesicle dehydration and rehydration" method and the average hydrodynamic diameter, zeta potential (Z) and the vesicles polydispersion index (IP) were determined by photon correlation spectroscopy. The cytotoxicity assay (CC<sub>50</sub>) was performed on the RAW 264.7 cell line by the MTT colorimetric method. The values of the inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) were determined by the colorimetric assay of resazurin in the *Leishmania (L.) infantum* strains (MCAN/BR/2002/BH401). Then, the selectivity index (SI) was calculated, established by the CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> ratio. BALB/c mice were treated according to the following protocols (n = 6): i- two doses of LAmB-PEG (5mg/kg/96h/IP); ii- two doses of LAmB-Conv (5mg/kg/96h/IP); iii- ten doses of AmB (5mg/kg/24h/IP); iv- 36 animals that received no treatment. After treatment, blood was collected and plasma aliquots were used to assess renal (serum urea and creatinine levels) and liver functions (levels of pyruvic transaminase, oxaloacetic transaminase, total serum proteins and albumin). BALB/c mice were infected with 10<sup>7</sup> *L. infantum* promastigotes (MCAN/BR/2002/BH401) and twenty-five days after infection, the animals were treated with two therapeutic protocols (n = 6): Protocol 1: i- two doses of LAmB-PEG (5mg / kg / 96h / IP); ii- two doses of LAmB-Conv (5mg / kg / 96h / IP); iii- ten doses of AmB (5mg / kg / 24h / IP); iv- ten doses of sterile saline solution (PBS) (24h). Protocol 2: i- two doses of LAmB-PEG (10mg / kg / 96h / IP); ii- two doses of LAmB-Conv (10mg / kg / 96h / IP); iii- ten doses of AmB (5mg / kg / 24h / IP); iv- ten doses of sterile saline solution (PBS) (24h). After treatment, the animals were sacrificed and the parasitic load on the liver and spleen was determined by qPCR. The formulations prepared in this work showed characteristics of stable, monodispersed nanosystems with an average hydrodynamic diameter of less than 200nm. LAmB-PEG showed CC<sub>50</sub>, equal to 328.55µg/mL and LAmB-Conv equal to 316.1µg/mL, both rates higher than free AmB (265.61µg/mL), suggesting less cellular toxicity of the drug in liposomal formulation. IC<sub>50</sub> values were similar for LAmB-PEG (20.365 ng/mL), LAmB-Conv (25.215ng/mL) and for free AmB (38.305 ng/mL), suggesting that there was no reduction in AmB leishmanicidal activity in the formulations .

Against intracellular amastigotes, LAmB-PEG significantly reduced infection rates of macrophages compared to control (untreated macrophages), and macrophages treated with LAmB-Conv and AmB-D. There was no change in renal function in the toxicity and therapeutic efficacy tests performed in a murine model. However, the enzymes TGO and albumin, used to assess liver function, were increased in the groups treated with LAmB-PEG, LAmB-Conv and AmB-D. The other parameters to assess liver function were within the reference levels for the formulations. The animals infected with *L. infantum* and treated with the formulation LAmB-PEG showed a significant reduction in the parasitic load on the liver and spleen in relation to the control group, in the evaluated therapeutic protocols (5mg/kg and 10mg/kg). At a dose of 10 mg/kg, in the spleen, the formulation LAmB-PEG showed a statistical difference with AmB, indicating an improvement in the efficacy of the drug when it was encapsulated in a liposomal vesicle. For the first time, proof of concept that the innovative formulations of LAmB-PEG and LAmB-Conv induce a significant reduction in infection rates of *L. infantum*, in vitro and in vivo, has been confirmed. These results reinforce the therapeutic potential of these formulations and open new perspectives for the treatment of VL.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis, treatment, amphotericin B, liposomes, prolonged circulation liposomes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> .....	19
<b>Figura 2</b> – Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp.....	20
<b>Figura 3</b> – Representação do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp .....	22
<b>Figura 4</b> – Fórmula estrutural da AmB .....	30
<b>Figura 5</b> – Comparação dos perfis cromatográficos para avaliação da estabilidade química da AmB utilizada nos lipossomas e da solução padrão de AmB.....	48
<b>Figura 6</b> – Comparação dos perfis cromatográficos das formulações LAmB-Conv, LAmB-PEG e solução padrão de AmB.....	48
<b>Figura 7</b> – Ensaio de eficácia de LAmB-Conv, LAmB-PEG e AmB-D contra amastigotas intracelulares de <i>Leishmania infantum</i> em macrófagos murinos.....	50
<b>Figura 8</b> – Taxa de infecção de <i>Leishmania infantum</i> (BH401), em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c .....	51
<b>Figura 9</b> – Níveis séricos de ureia, proteínas totais, albumina, transaminases pirúvicas e oxalacéticas (TGP e TGO) determinados em camundongos BALB/c.....	53
<b>Figura 10</b> – Carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> determinada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) em camundongos tratados com o protocolo terapêutico 1.....	55
<b>Figura 11</b> – Carga parasitária de <i>Leishmania infantum</i> determinada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) em camundongos tratados com o protocolo terapêutico 2.....	56

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Caracterização dos lipossomas convencionais contendo AmB (LAmB-Conv) e lipossomas peguilados contendo AmB (LAmB-PEG) .....47

**Tabela 2** – Valores de  $CC_{50}^a$  determinados para macrófagos RAW 264.7, valores de  $CI_{50}^b$  determinados para formas promastigotas de *Leishmania infantum* e índice terapêutico (IT)<sup>c</sup> após incubação por 24h com formulações testadas .....49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS: Síndrome da Imunodeficiência adquirida
- AM: Antimoniato de meglumina
- AmB: Anfotericina B
- AmB-D: Anfotericina B desoxicolato
- CC<sub>50</sub>: Concentração citotóxica em 50%
- CEUA: Comitê de Ética na Utilização de Animais
- COL: Colesterol
- CI<sub>50</sub>: Concentração inibitória em 50%
- CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DAD: Detector de Arranjos de Diodos
- DCP: Dicetilfosfato
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DSPE-PEG2000: Diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000
- HePC: Miltefosina
- HIV: Vírus da imunodeficiência humana
- IP: Intraperitoneal
- LC: Leishmaniose cutânea
- LCM: Leishmaniose cutâneomucosa
- LT: Leishmaniose tegumentar
- LV: Leishmaniose visceral
- MLV: Vesícula multilamelar
- MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PEG: Polímero de etileno glicol
- PBS: Tampão fosfato salino
- PSG: “*Promastigote secreted gel*”
- qPCR: PCR quantitativa
- REBIR/UFU: Rede de biotério de roedores da Universidade Federal de Uberlândia
- RPM: Rotações por minutos
- SFB: Soro fetal bovino
- SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificações
- SMF: Sistema mononuclear fagocitário

SUV: Vesícula unilamelar pequena

TGP: Transaminase glutâmico oxalacética

TGO: Transaminase glutâmico pirúvica

$\alpha$ -MEM: Minimum Essencial Medium Alpha modification

## SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
1.1. Leishmanioses .....	18
1.2. Morfologia .....	21
1.3. Transmissão e ciclo biológico .....	22
1.4. Leishmaniose visceral .....	24
1.5. Leishmaniose visceral no Brasil .....	27
1.6. Quimioterapia convencional da leishmaniose visceral no Brasil e suas limitações .....	29
1.6.1. Antimoniais .....	29
1.6.2. Miltefosina .....	30
1.6.3. Desoxicolato de AmB e AmB lipossomal .....	31
1.7. Lipossomas como nanocarreadores de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral .....	35
1.7.1. Lipossomas: propriedades e aplicação no tratamento da leishmaniose visceral .....	35
2. JUSTIFICATIVA .....	36
3. OBJETIVO GERAL.....	37
3.1. Objetivos Específicos .....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Preparo e caracterização das formulações .....	38
4.1.1. Preparo dos Lipossomas peguizados e convencionais contendo AmB .....	38
4.1.2 Avaliação da taxa de encapsulação .....	39
4.1.2.1 Seletividade do método .....	39
4.1.2.2 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da AmB .....	40
4.2. Parasitos .....	41
4.3. Animais .....	41
4.4. Ensaio <i>in vitro</i> .....	42
4.4.1. Ensaio de citotoxicidade das formulações sobre linhagem de macrófagos/monócitos RAW 264.7 .....	42
4.4.2. Eficácia <i>in vitro</i> das formulações sobre a viabilidade das formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> .....	43
4.4.3. Índice de seletividade <i>in vitro</i> .....	43
4.4.4. Exposição dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> as formulações lipossomais contendo AmB .....	43

4.5. Ensaio de toxicidade das formulações em camundongos BALB/c .....	45
4.6. Testes de eficácia em modelo murino nas doses 5mg/kg e 10 mg/kg .....	45
4.7. Análise estatística .....	47
5. RESULTADOS .....	48
5.1. Caracterização das formulações LamB-Conv e LAmB-PEG .....	48
5.2. Ensaios <i>in vitro</i> das formulações LamB-Conv e LAmB-PEG .....	50
5.3. Avaliação da toxicidade das formulações LAmB-Conv e LAmB-PEG em modelo murino .....	52
5.4. Eficácia terapêutica <i>in vivo</i> .....	55
6. DISCUSSÃO .....	57
7. CONCLUSÕES .....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
9. ANEXO 1 .....	82

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1. Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças crônicas e infecciosas com grande prevalência mundial, causadas por um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903; CHARLTON et al., 2018). Constituem um complexo de enfermidades que atingem o homem, animais silvestres e domésticos.

Uma grande variedade de mamíferos silvestres e domésticos são considerados hospedeiros vertebrados de *Leishmania* spp. Entre as principais espécies estão os animais pertencentes às ordens Edentata (tatus e preguiças), Carnívora (cães e gatos), Rodentia (ratos), Primata (humanos e não humanos) e Marsupialia (gambás). Com algumas exceções, as leishmanioses são zoonóticas e a infecção em humanos é acidental (CDC, 2018; CHARLTON et al., 2018; WHO, 2019).

Na área urbana, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório do parasito. Em 1908 sua participação no ciclo biológico da LV foi proposta por Nicolle e Comte, na Tunísia, quando foi detectado o agente etiológico nessas espécies (CHAGAS, 1936). No Brasil, Evandro Chagas observou a presença da doença no homem e no cão, além da infecção no *Lutzomia longipalpis*, sendo realizada nesse período a classificação do parasito como *Leishmania (L.) chagasi* (CHAGAS et al., 1938). Em 1956, o cão e a raposa foram considerados como reservatórios naturais nas áreas de grande expressão endêmica, e a partir desse período a leishmaniose foi considerada uma zoonose (DEANE; DEANE, 1962). Em florestas do norte e nordeste do Brasil, outros animais foram diagnosticados com a parasitose, e a partir desse momento o governo iniciou as primeiras campanhas para controle da LV no país (VIDES et al., 2011).

De acordo com a forma que o parasito se divide no inseto vetor ele pode ser dividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Figura 1). No subgênero *Leishmania* estão incluídos o complexo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*) e o complexo *L. mexicana* (*L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*), *L. (L.) tropica*; *L. (L.) major*; *L. (L.) aethiopica*). No subgênero *Viannia* estão incluídos o complexo *L. braziliensis* (*L. (V) braziliensis* e *L. (V) peruviana*) e o complexo *L. guyanensis* (*L. (V) guyanensis* e *L. (V) panamensis*) (ALVAR et al., 2012; CHARLTON et al., 2018; WHO, 2019) (Figura 1). As espécies causadoras das leishmanioses são consideradas

morfologicamente indistinguíveis, porém podem ser diferenciadas por meio da análise de isoenzimas, por métodos moleculares ou anticorpos monoclonais (PAHO, 2014)

As leishmanioses humanas podem apresentar distintas manifestações clínicas no hospedeiro vertebrado, sendo as formas clínicas básicas a leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (BRAGA, 2019). A LT pode causar diversas síndromes clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania*, podendo ser dividida em leishmaniose cutânea; leishmaniose cutânea mucosa; leishmaniose cutânea difusa ou anérgica (HANDLER et al., 2015).

A leishmaniose cutânea é a forma mais frequente da doença na qual o indivíduo apresenta lesões numa área exposta da superfície corporal, variando em número de um a dez. Essa forma é considerada de menor importância. Conhecida popularmente como espúndia, a leishmaniose cutânea mucosa, também, causa ulcerações que são progressivamente destrutivas nas mucosas como boca, nariz, faringe e laringe, sendo considerada grave, causando a mutilação da face e provocando sofrimento para o paciente. A manifestação clínica que a leishmaniose cutânea difusa causa são feridas não ulceradas, que apresentam grande quantidade de parasitos na pele do indivíduo e anergia ao teste intradérmico de Montenegro (GOTO; LINDOSO, 2010; RIBAS-SILVA et al., 2013; BRASIL, 2014).

A LT apresenta ampla distribuição mundial, estando presente em vários países. No continente americano, esta forma é denominada como leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo encontrados casos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2017).

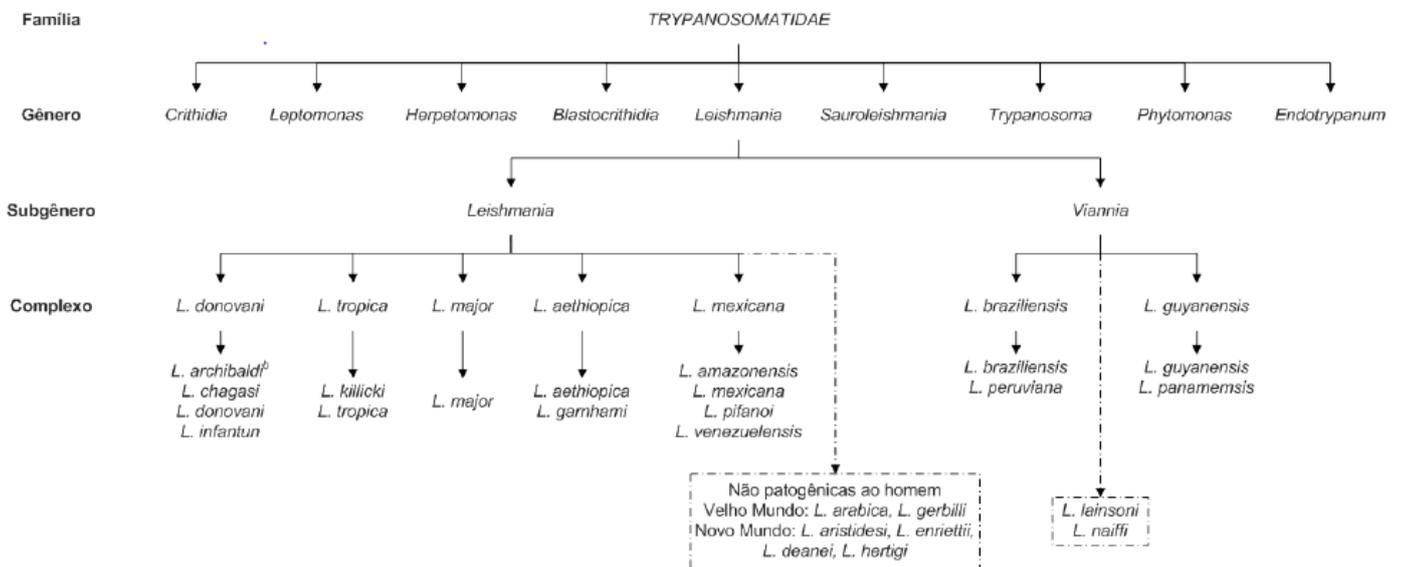
A LV é uma doença de curso crônico e na maioria dos pacientes é assintomática. É uma infecção causada por *Leishmania donovani* (Velho Mundo) e *Leishmania infantum* (Novo Mundo) (GRIENSVEN; DIRO, 2012; BUSH et al., 2017;). Quando associada à má nutrição e/ou outras condições debilitantes, como co-infecções com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), geralmente se manifesta na forma clínica clássica com febre, esplenomegalia, hepatomegalia, alterações do sistema hematopoiético como anemia, leucopenia e trombocitopenia, hipergamaglobulinemia. Ainda há perda de peso, linfadenopatia, epistaxe, diarreias e edemas. Neste estágio, se não diagnosticada, tratada adequadamente a tempo, mais de 90% dos pacientes evoluem para o óbito (CHAPPUIS et al., 2007; WHO 2010).

As leishmanioses ocorrem em 98 países, dos quais 79 são considerados subdesenvolvidos, e aproximadamente 310 milhões de pessoas estão expostas a contrair a doença. A incidência anual é de 1,3 milhões de casos, e destes, 1 milhão de pessoas são

acometidas pelas formas tegumentares da doença, sendo que cerca de 300.000 são da LV. Quando a doença não é diagnosticada e tratada a tempo, o número de indivíduos doentes que evoluem para o óbito vai de 20.000 a 30.000 (STEVERDING, 2017; WHO 2019). Em 2017, cerca de 94 % dos casos de LV reportados a Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Sudão e Sudão do Sul. A maioria dos casos de leishmaniose cutânea (LC) ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e na República Árabe da Síria (WHO, 2019).

Nas Américas, no período de 2001 a 2016 foram reportados 55.530 casos humanos, com uma média anual de 3.457 casos. Em 2016 foram registrados 3.354 casos com uma incidência de 4,51 e 1,04 casos por 100.000 habitantes, considerando a população de áreas de transmissão e população total do país. Esses casos foram reportados em sete países (Argentina, Brasil, Colômbia, Guatemala, Honduras, Paraguai e Venezuela), distribuídos em 54 estados/departamentos e 935 municípios (OPAS, 2018). A maioria dos casos foram reportados em indivíduos do sexo masculino com 66,3% (2.223) sendo que as faixas etárias mais acometidas foram: < 10 anos com 39,1% (1.313), seguido de  $\geq 20 < 50$  anos (34,7%) e de > de 50 anos (16,96%). Em relação a letalidade da doença, nesse mesmo período foi reportado 7,9%, sendo considerada a maior letalidade anual registrada na América desde 2012 (OPAS, 2018).

As leishmanioses são de grande importância para a saúde pública e constituem, atualmente, o segundo grupo de doenças parasitárias que mais mata no mundo, ficando atrás somente da malária. E está entre as mais importantes doenças não contagiosas negligenciadas combatidas pela OMS e o quarto em morbidade entre as infecções tropicais (WHO, 2017). Houve grande avanço nos últimos 10 anos em relação ao tratamento, prevenção e diagnóstico das leishmanioses, porém as altas taxas de mortalidade e morbidade ainda continuam apresentando um crescimento preocupante (WHO, 2017).

**Figura 1** – Taxonomia do gênero *Leishmania*.

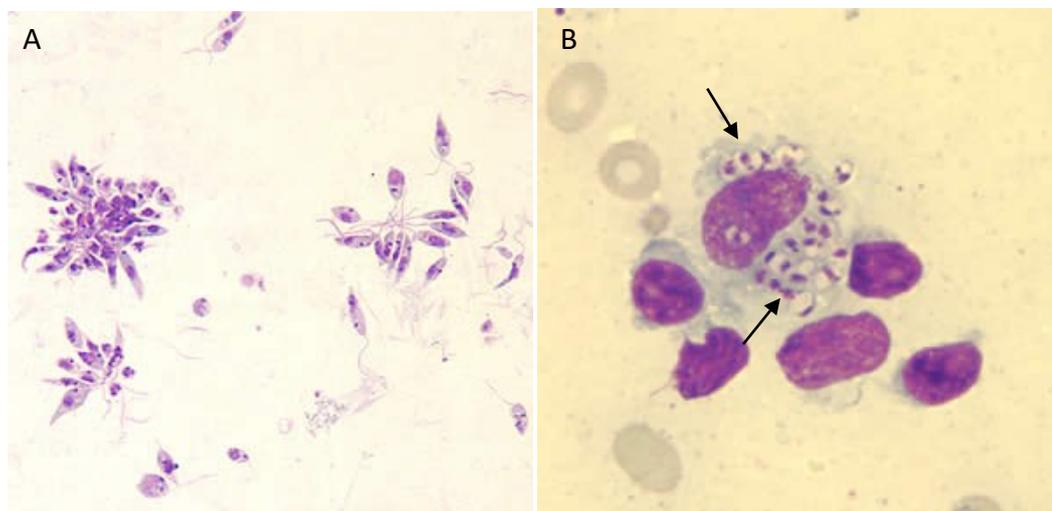
Fonte: Brasil, 2006.

## 1.2. Morfologia

Protozoários do gênero *Leishmania*, são organismos digenéticos e apresentam morfologicamente as duas formas evolutivas principais: promastigota, forma flagelada, móvel, longa e achatada, com cinetoplasto na posição anterior do parasito, próximo ao flagelo. Presente no tubo digestório do inseto vetor, medindo cerca de 10-15µm de comprimento (Figura 2A), e as formas amastigotas, imóveis e sem flagelo aparente, apresentando um núcleo relativamente grande e redondo ocupando de metade a dois terços do corpo celular e vivem e se multiplicam no interior de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) do hospedeiro vertebrado e medem cerca de 2-5µm (Figura 2B) (GRIMALDI; TESH, 1993; SONADA, 2007; WHO, 2010).

*Leishmania*, da mesma forma que outros tripanossomatídeos, possuem uma mitocôndria única e ramificada, que se estende por todo o corpo celular e tem material genético localizado em região específica da organela, o cinetoplasto. O cinetoplasto está localizado em região vizinha ao corpo basal do flagelo, é responsável pela síntese e armazenamento de uma molécula de DNA menor (minicírculo) e outra maior (maxicírculo), ambos presentes na mitocôndria (SIMPSON, 1986).

**Figura 2** – Formas evolutivas de *Leishmania* sp. (A) formas promastigotas do parasito em meio extracelular; (B) formas amastigotas no interior de macrófagos.



Fonte: DPDx, 2017.

### 1.3. Transmissão e ciclo biológico

As leishmanioses possuem um ciclo biológico caracterizado como heteroxênico, necessitando de dois hospedeiros, sendo um invertebrado, representado pelo inseto vetor e um vertebrado representado por canídeos silvestres e domésticos, roedores e humanos (LAINSON; SHAW, 1987; SCHLEIN, 1993) (Figura 3).

Embora existam outras formas de transmissão das leishmanioses descritas na literatura (picada de carrapato ou pulga, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes de laboratório e compartilhamento de seringas no uso de drogas injetáveis) a mais comum é pela picada de dípteros denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (BRUSCHI; GRADONI, 2018). Os flebotomíneos são insetos pequenos e possuem o hábito de vida crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares protegidos e úmidos, sendo então encontrados em diferentes regiões geográficas com diferentes condições climáticas e ambientais. A maioria desses insetos habita o ambiente silvestre, porém pode se alimentar em homens e animais, cujas habitações estão próximas a regiões de mata. Somente as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas. Algumas espécies apresentam acentuada antropofilia e domiciliação, o que as tornam epidemiologicamente importantes na transmissão de doenças (LAINSON; SHAW, 1998; BRUSCHI; GRADONI, 2018).

A maior concentração de espécies de flebotomíneos é encontrada nas florestas da América do Sul, no qual o gênero predominante é *Lutzomyia*. O gênero *Lutzomyia* é

encontrado no Novo Mundo já o gênero *Phlebotomus* é distribuído no Velho Mundo, nas zonas áridas e semiáridas. Apenas esses dois gêneros de flebotomíneos possuem importância médica, por serem os transmissores das leishmanioses (RODRIGUES et al., 2015; OPAS, 2018).

A infecção do vetor ocorre quando fêmeas adultas de flebotomíneos, ao realizar repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, ingerem as formas amastigotas, presentes nas células do SMF da pele do mesmo. No intestino médio do inseto, o sangue ingerido começa a ser envolvido por uma membrana, denominada de matriz peritrófica, constituída de quitina, proteínas e glicoproteínas secretadas pelas células do próprio epitélio intestinal do inseto (RODRIGUES et al., 2015; WAGNER et al., 2019).

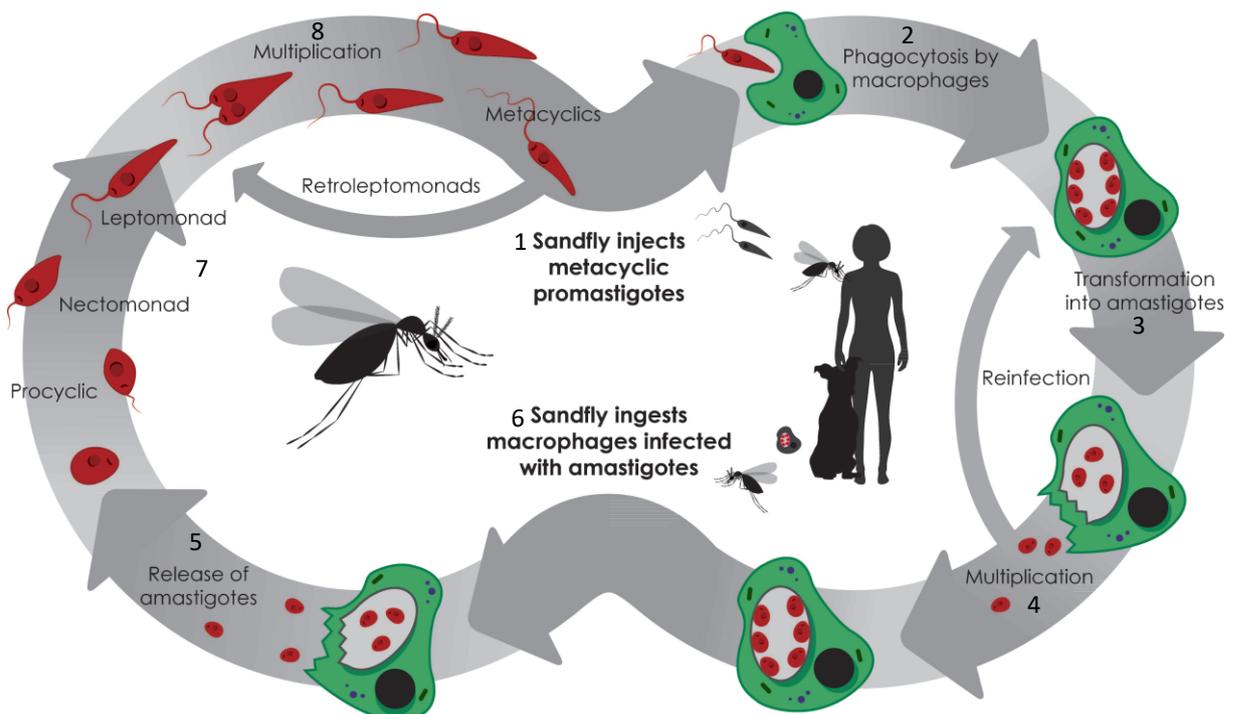
Nesse local ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando as formas amastigotas. Essas formas sofrem alterações das condições fisiológicas, como redução da temperatura e aumento do pH, diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas flageladas que se replicam intensamente, essas formas flageladas são mais resistentes a ação das enzimas digestivas. As promastigotas passam por um processo de metacicloênese no tubo digestório do vetor, onde ocorrem mudanças morfológicas e fisiológicas, originando as formas promastigotas metacíclicas infectantes. Essas formas se direcionam para a proboscíde do inseto, onde são inoculadas na pele de um novo hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (KAYE; SCOTT, 2011; CDC, 2018; WAGNER et al., 2019).

No tubo digestório do inseto vetor, as promastigotas metacíclicas produzem uma glicoproteína de consistência gelatinosa chamada PSG (*promastigote secretory gel*). Acredita-se que esse gel obstrua a passagem de alimento, quando há o repasto sanguíneo-tissular, o flebotomíneo é obrigado a regurgitar saliva juntamente com as formas promastigotas metacíclicas no local da picada (BATES, 2008).

Uma vez inoculadas na pele do hospedeiro, as formas promastigotas metacíclicas podem ser fagocitadas primeiramente por neutrófilos recrutados para o sítio da infecção. Essas células infectadas passam a emitir sinais quimiotáticos que recrutam monócitos/macrófagos que iniciam o processo de fagocitose dos neutrófilos infectados, fagocitando assim os parasitos que são internalizados no vacúolo parasitóforo, ligando-se aos lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal (WALLER; MCCONVILLE, 2002). No interior deste vacúolo, o parasito permanece em um ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais e metabólitos reativos do oxigênio. Entre uma a quatro horas, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, iniciando uma reprodução por divisão binária dentro do vacúolo parasitóforo. Quando os macrófagos estão repletos com amastigotas, eles

se rompem e liberam os parasitos que vão infectar outros macrófagos, que poderão ser ingeridos pelo inseto vetor no momento do repasto sanguíneo (CDC, 2018; PETERS et al., 2008; PIMENTA et al., 2012; SACKS; SHER, 2002) (Figura 3).

**Figura 3** – Representação do ciclo de vida de *Leishmania* spp (Adaptado de WAGNER, 2019). (1) inoculação de promastigotas durante o repasto sanguíneo; (2) promastigotas fagocitadas pelas células do SMF; (3) parasitos são internalizados no vacúolo parasitóforo, que se liga aos lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal e se diferenciam em amastigotas intracelulares; (4) multiplicação das amastigotas; (5) ruptura das células liberando as formas amastigotas que vão infectar novas células; (6) Repasto sanguíneo, ingestão de macrófagos infectados pelo inseto vetor; (7) transformação das amastigotas em promastigotas no intestino do vetor; (8) Divisão e migração para a proboscíde do inseto.



Fonte: Wagner, 2019.

#### 1.4. Leishmaniose Visceral

A LV é uma doença fatal com distribuição em 76 países, sendo endêmica em 12 países das Américas. Porém, aproximadamente 94% dos casos notificados ocorrem em Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sul do Sudão (ALVAR et al., 2012; OPAS, 2018; WHO, 2019). Dentre os indivíduos acometidos, cerca de 20.000 a 30.000 evoluem para o óbito o que torna a LV a segunda mais grave doença causada por protozoário, número menor

somente que os apresentados pela malária. Acredita-se que o número de casos de LV e de óbitos anual seja subestimado, uma vez que a notificação compulsória ocorre apenas em 32 dos 98 países em que as leishmanioses ocorrem (DESJEUX 2004; CHAPPUIS et al., 2007; WHO 2017).

As manifestações clínicas associadas à LV são atribuídas a parasitos pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, que é representado pelas espécies *L. (Leishmania) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (LAINSON; SHAW, 1987; MAURICIO et al., 2001; WHO 2010). *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* de várias regiões geográficas possuem diferenças mínimas, não tendo sido possível a distinção entre elas por estudos bioquímicos e moleculares (MAURICIO et al. 2001). Assim, autores sugerem que as duas espécies devam ser consideradas como um grupo monofilético, adotando *L. (L.) chagasi* como sinónimo de *L. infantum*.

O período de incubação da doença pode variar de meses a anos, durante os quais o parasito se dissemina pelo corpo (OLIVA et al., 2006). Porém, o surgimento da doença e sua evolução, são conseqüências de um complexo de interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (MANNA, 2006).

As espécies causadoras da LV possuem um forte tropismo tecidual, estabelecendo-se primariamente, em órgãos viscerais como o fígado, baço, e medula óssea. A lesão primária na pele é raramente observada e uma porcentagem substancial das infecções parece ser assintomática ou auto-resolutiva (JAFFE; GREENBLATT, 1991). Já a doença ativa, conhecida como leishmaniose visceral clássica, quando não tratada, pode levar ao óbito em 95% dos pacientes (BRAGA, 2019).

Apesar de *Leishmania (L.) infantum* acometer indivíduos de qualquer faixa etária, a doença é mais frequente em crianças menores de 10 anos (46,2%) e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (62,2%) (BRASIL, 2014).

Em razão de suas características epidemiológicas, a transmissão LV ocorre em complexo sistema biológico que envolve o hospedeiro humano, o parasito, o hospedeiro invertebrado e, em algumas situações, um reservatório animal (WHO, 2019).

De acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, hospedeiros invertebrados e reservatórios, a LV pode apresentar caráter antroponótico em alguns países ou regiões, como na Índia, Nepal, Sudão, Quênia e nordeste da China, onde o homem é o reservatório do parasito, ou zoonótico, como nos países europeus, nas Américas Central e do Sul, inclusive no Brasil, onde os principais reservatórios do parasito são membros da Família Canidae, em

especial o cão doméstico (*Canis familiaris*), nos quais causam a leishmaniose visceral canina (LVC) (WHO 2010).

Animais silvestres como os canídeos *Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*, além de roedores e marsupiais como *Proechimys canicollis*, *Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis* são considerados os possíveis reservatórios e os responsáveis pela manutenção do parasito no ambiente silvestre (LAINSON; SHAW, 1987; BRASIL, 2006; BRASIL, 2017).

Já o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório do parasito no ciclo rural e urbano. Sua importância tem sido apontada, principalmente por estudos realizados em algumas cidades brasileiras, como responsável pelo aumento no número de casos humanos, visto que a presença de casos caninos se correlaciona com a ampliação da ocorrência de casos humanos de LV (BEVILAQUA et al., 2001; BRASIL, 2017).

A grande importância da LV na saúde pública se deve à expansão geográfica para áreas até então livres da doença, e inclui ainda a urbanização, reemergência em focos endêmicos antigos e alta letalidade em humanos, principalmente nos indivíduos não tratados ou com tratamentos tardios, além de casos de crianças desnutridas (BRASIL, 2014). Também se caracteriza como doença negligenciada, com baixo investimento em pesquisa por parte da indústria farmacêutica. Além disso, o desconhecimento da população e dos órgãos de saúde sobre suas características e o período de incubação extenso levam a diagnóstico tardio, acentuando seu caráter potencialmente fatal (LAINSON; SHAW, 1987; BRASIL, 2006). Quando não tratada, essa doença pode evoluir para óbito em mais de 95% dos casos (BRAGA, 2019).

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).

Para a Organização Mundial da Saúde - OMS (2010), a coinfeção 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 coinfeção entre LV e HIV (WHO, 2010).

O diagnóstico de LV no Brasil e nos demais países onde a doença é endêmica, necessita de amostras de tecidos obtidos por aspiração de medula óssea, do baço e de

linfonodos para demonstração microscópica das formas amastigotas do parasito em esfregaços (MELO, 2013). Em relação ao aspirado do baço, a sensibilidade diagnóstica é elevada (95% - 98%), porém o procedimento acarreta um risco de hemorragia ao indivíduo. A sensibilidade da análise de medula óssea é considerada mais baixa (53% - 95%) e ambas as técnicas exigem habilidades profissionais que não estão uniformemente disponíveis em todos os serviços de saúde. Diagnóstico por cultura ou Reação da polimerase em cadeia (PCR) de material aspirado, melhoram a sensibilidade do exame parasitológico, porém o primeiro é demorado e o último raramente é realizado fora do laboratório de pesquisa (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007; SUNDAR, 2002).

É alta a correlação entre a condição socioeconômica da população e a doença, e entre os fatores de risco de se contrair LV 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). Segundo a OMS (2010), a relação entre a LV e a pobreza é complexa, pois aumenta o risco de infecção e agrava a progressão da doença que, por si só, pode agravar o empobrecimento da família, devido as despesas com saúde, e a perda de renda com a convalescência e morte de assalariados. Estratégias de controle que não levam em conta este contexto sócio-econômico serão de difícil sustentação.

### **1.5. Leishmaniose visceral no Brasil**

O Brasil é responsável pela quase totalidade dos casos de LV na Américas, respondendo por cerca de 96% dos registros no continente, e 22 das 27 Unidades Federadas, apresentam casos autóctones (ROMERO; BOELAERT, 2010; OPAS, 2018), sendo que se destacam as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. No ano de 2016 foi observada uma dispersão em Roraima, Norte do Brasil, onde foram registrados casos nas áreas de fronteira com a Venezuela, o que requer uma maior atenção e fortalecimento da vigilância nos municípios desses países (OPAS, 2018).

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, BRASIL, 2014). 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, 2008; COSTA, 2011).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), em 25 anos de notificação (1990-2015) os casos de LV somaram 81722, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram na região Nordeste. Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram nesta região. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões e atingiu áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e, no ano de 2015, a Região Nordeste apresentou uma redução para 55% dos casos no país (SINAN, 2019). Ao longo dos anos os casos passaram a ser notificados com mais frequência em outras regiões, como Norte, Centro-oeste e Sudeste (HARHAY et al., 2011; MARCONDES; ROSSI, 2013). A expansão atingiu todo o território brasileiro, principalmente em municípios com crescente urbanização e alto índice de pobreza (MARQUES et al., 2017).

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; BRASIL, 2006; COSTA 2008; MAIA-ELKHOURY et al., 2008). O processo de urbanização é nítido quando comparamos o número de cidades com mais de cem mil habitantes, que apresentavam mais de dez casos da doença/ano, entre os anos de 1980-1989, e os anos 2000-2009, representando um aumento de 585% para o período (COSTA, 2011).

Os dados epidemiológicos dos últimos anos confirmam a urbanização da LV. O fenômeno atual da urbanização em larga escala começou em 1981, quando a epidemia de LV atingiu Teresina e, em seguida, São Luís, espalhando por todo o país, afetando vários estados, incluindo São Paulo e Rio Grande do Sul, e grandes centros, como Belo Horizonte e a capital, Brasília (COSTA et al., 2011b). Minas Gerais, em 2015, notificou 418 casos, 78% dos casos da Região Sudeste (SINAN, 2019). Belo Horizonte possui uma das maiores prevalências de LV humana no Brasil, sendo registrados casos desde o ano de 1994 (HARHAY, et al., 2011). No ano de 2017 já foram confirmados 20 casos na cidade e três óbitos (PREFEITURA DE BELO HORIZONTE, 2019).

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 e, principalmente, na eliminação dos reservatórios domésticos - os cães, e atividades de educação em saúde (BRASIL, 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).

## **1.6. Quimioterapia convencional da leishmaniose visceral no Brasil e suas limitações**

### **1.6.1. Antimoniais**

A principal medida de controle de todas as formas de leishmanioses no homem continua sendo a quimioterapia. O tratamento deve ser realizado após a confirmação da doença, sendo os fármacos de primeira escolha no Brasil e no mundo, derivados do antimônio pentavalente ( $Sb^{5+}$ ) há dois tipos que são utilizados: antimoniato de N-metil d-glucamina (AM) empregado há mais de 70 anos no país, e estibogluconato de sódio, que não é comercializado no Brasil (BRAGA, 2019; KUMAR et al., 2017). Estes compostos agem inibindo enzimas do parasito que são utilizadas na oxidação de ácidos graxos e glicólico, resultando na depleção dos níveis de ATP intracelular, além da redução do antimônio pentavalente para trivalente ( $Sb^{5+}$  em  $Sb^{3+}$ ), a forma tóxica para os parasitos, capaz de interferir no metabolismo dos tióis (ROMERO *et al.*, 2017). A dose recomendada dos antimoniais deve ser calculada em mg  $Sb^{5+}$ /kg/dia (WHO, 2018).

Os antimoniais são amplamente conhecidos por sua toxicidade e além de tóxicos (3-5% mortes são atribuídas aos eventos adversos), o tempo de tratamento também é considerado longo (20 a 30 dias), e é acompanhado por aumento nas taxas de falha (WHO, 2010).

Embora seja o medicamento de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, seu uso clínico apresenta diversas limitações, como a necessidade de administração parenteral diariamente e durante três ou mais semanas, e efeitos colaterais como náusea, vômito, fraqueza, cólica abdominal, mialgia, diarreia, hepatotoxicidade, erupções cutâneas e cardiotoxicidade (BRASIL, 2017). Além disso, o AM não deve ser administrado em gestantes, pois atravessa a barreira transplacentária, podendo impregnar no tecido nervoso do feto, levando a síndromes de retardamento mental. Também há restrições do uso deste fármaco em

pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (BRASIL, 2009).

O antimoniato de meglumina (AM) (Glucantime®, Rhodia) é o derivado de antimônio pentavalente atualmente em uso no Brasil. Devido a sua baixa absorção oral e seu elevado *clearance* plasmático, este composto é administrado diariamente por via parenteral (injeção intravenosa ou intramuscular), por um período longo, de 20 a 40 dias (BRASIL, 2011).

Os efeitos colaterais representam um problema importante no uso dos antimoniais pentavalentes. Aparecem principalmente ao final do tratamento e incluem náuseas, vômitos, diarreia, artralgias, mialgias, anorexia, elevação dos níveis de enzimas hepáticas, anomalias eletrocardiográficas, convulsões, pancreatite química e nefrotoxicidade (RIBEIRO et al., 2014). Reclamações de pacientes com sensação de dor no local e no momento da aplicação desses medicamentos são também comuns. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) registrou 14 mortes causadas pelo uso de antimoniais em 2000 e o número aumentou para 17 em 2001 (BRASIL, 2006). Atualmente o MS recomenda criterioso protocolo de acompanhamento dos pacientes tratados com antimoniais pentavalentes, visando minimizar os possíveis eventos adversos relacionados ao seu uso (BRASIL, 2014).

A ampla utilização, às vezes incontrolada, dos antimoniais pentavalentes levou à seleção de parasitos que apresentam mecanismos de resistência a esses medicamentos. Os relatos de pacientes não responsivos às drogas, têm aumentado vertiginosamente, seja devido a essa seleção ou à imunossupressão, causada principalmente pela coinfeção com o HIV. Atualmente, o aumento expressivo dos casos de resistência aos antimoniais constitui um dos fatores mais importantes relacionados a reemergência da doença em nível mundial (BERMAN, 1997, WHO, 2010). Como exemplo, cita-se o Estado de Bihar, na Índia, onde cerca de 70% dos casos de LV não respondem mais aos tratamentos com fármacos a base de antimônio (WHO, 2010).

### **1.6.2. Miltefosina**

A hexadecilfosfocolina (miltefosina) inicialmente foi desenvolvida como droga antineoplásica e foi o primeiro medicamento a ser administrado por via oral com eficácia no tratamento da LV (SUNYOTO, 2018). Esse medicamento tem sido relatado com altas taxas de eficácia, mesmo em casos não responsivos aos antimoniais, mas é teratogênico e é suspeito de rapidamente dar origem a resistência, devido a sua meia-vida longa (DUBE, 2005; CHOUDHURY et al, 2008). Este fármaco é usado em alguns países tanto para o tratamento da LV quanto para a LT (BHATTACHARYA et al., 2007; SUNYOTO et al., 2018).

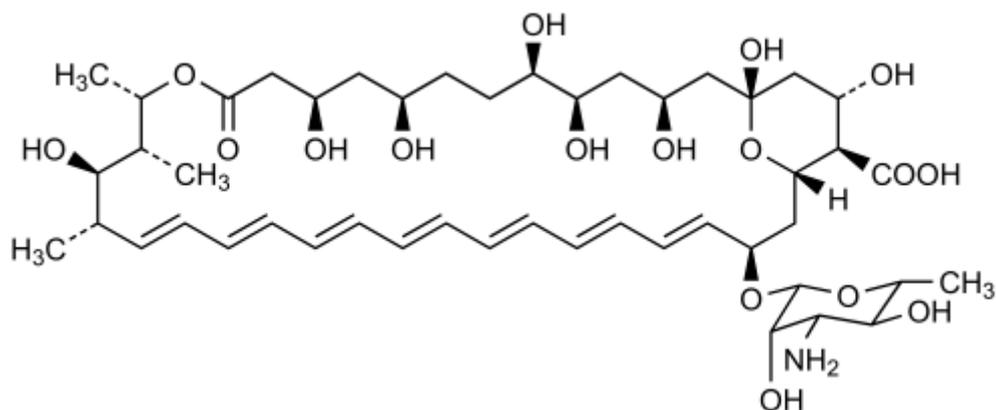
A miltefosina possui a capacidade de interferir na membrana celular do parasito, sem que haja interação com o DNA, e depois dessa interferência, o fármaco altera a permeabilidade, a composição lipídica e a fluidez da membrana fazendo com que haja apoptose (PARIS, 2004; VERMA; DEY, 2004). Este medicamento apresenta efeitos colaterais como nefrotoxicidade, teratogenicidade, problemas gastrointestinais devido a sua administração por via oral. Também apresenta meia-vida prolongada (150 a 200h), que acaba favorecendo a seleção de parasitos resistentes à droga (BHATTACHARYA et al., 2007; SUNDAR; AGARWAL, 2017).

Em razão dessa limitação, uma formulação intravenosa capaz de concentrar a droga nos órgãos ricos em células do SMF, que são alvos naturais do parasito (fígado, baço, medula óssea, linfonodos, dentre outros) é de grande interesse principalmente para pacientes que têm perturbações gastrointestinais (PAPAGIANNAROS et al., 2005).

### 1.6.3. Desoxicolato de AmB e AmB lipossomal

Anfotericina B (AmB) é considerado o fármaco de segunda escolha para o tratamento da LV e LTA e, ao lado do AM, são as drogas leishmanicidas mais eficazes disponíveis comercialmente (BRAGA, 2019). É um antibiótico da classe dos polienios macrolídeos, produzido a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosus*. No final dos anos 50 a AmB já era usada em alguns casos clínicos e em 1965 foi aprovada pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), sendo o primeiro antifúngico a ser aprovado pelo referido órgão. Atualmente considerado o fármaco mais potente contra todas as formas clínicas de leishmaniose, esse medicamento é primariamente um antibiótico que apresenta importante atividade fungicida e contra algumas espécies de protozoários, incluindo os do gênero *Leishmania* (LEMKE et al., 2005, WHO, 2019).

A AmB é um pó amarelo a alaranjado, inodoro e quase insípido. A fig. 4 representa a estrutura química complexa do fármaco que apresenta características hidrofóbicas, em decorrência da parte apolar de sua molécula, caracterizada pela presença de sete duplas conjugadas carbono-carbono; e características hidrofílicas, decorrentes da presença de inúmeros grupos hidroxila. Além disso, ela possui os grupos carboxílico e amino, proporcionando propriedades anfílicas (DAMASCENO, 2010), sendo solúvel em água em pH abaixo de 2 ou acima de 11, entretanto, nessas condições extremas, o fármaco não é estável (TORRADO et al., 2008).

**Figura 4** – Fórmula estrutural da AmB.

**Fonte:** CALDEIRA,2011.

Em água em pH fisiológico (6 a 7), a solubilidade dela é muito baixa, inferior a 1 mg/L (TORRADO et al., 2008), sendo solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO), levemente solúvel em dimetilformamida, muito levemente solúvel em metanol, praticamente insolúvel em álcool (BRITISH Pharmacopoeia, 2005) e insolúvel em grande parte de solventes orgânicos (EGITO et al., 2002). A insolubilidade da AmB em água leva à formação de agregados em concentrações definidas.

O mecanismo de ação da AmB está baseado na ligação do fármaco ao ergosterol ou episterol da membrana celular da *Leishmania*. Nos mamíferos, a AmB possui capacidade em se ligar ao colesterol da membrana celular, o que parece estar relacionado aos efeitos adversos do fármaco nestes. A ligação ao ergosterol provoca uma desorganização estrutural na membrana, formando poros que alteram sua permeabilidade ao potássio intracelular, acarretando em morte do parasito por lise osmótica (LEMKE et al., 2005).

Seu tempo de meia-vida é de 24 a 48h, sendo que a eficácia desse fármaco não está relacionada aos seus níveis plasmáticos, pois a AmB é fortemente ligada às lipoproteínas. Após 24h, grande parte desse antibiótico é acumulada em vários órgãos, especialmente o fígado, sendo apenas cinco por cento metabolizado pelos rins e a dose remanescente é excretada pela bile e fezes (GOLENSER; DOMB, 2006).

Atualmente existem duas apresentações comerciais de AmB: o desoxicolato de AmB (AmB-D) e a AmB lipossomal, sendo a eficácia dessas apresentações comparáveis, porém a forma lipossomal apresenta menor toxicidade (BRASIL, 2017).

O AmB-D é utilizado como segunda linha de tratamento para a LV desde os anos de 1960, disponível comercialmente como Fungizone® (Bristol-Myers-Squibb, EUA). Atualmente, no Brasil, encontra-se comercialmente disponível o Anforicin B® (Cristália

Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Brasil) como formulação convencional. Este fármaco exibe uma excelente atividade leishmanicida com taxas de cura maiores que 90%-95% em trabalhos no Brasil, Índia, e outros países endêmicos, sendo observado que recaídas e não respostas são raras, exceto entre os pacientes infectados pelo vírus HIV, nesses casos episódios secundários de LV são comuns, principalmente por recaída em 7 de 10 casos, mas também há casos de reinfecções (SUNDAR et al., 2007; LACHAUD et al., 2009; GRAY, 2012).

Sendo praticamente insolúvel em água, a AmB possui baixa absorção por via oral (<5%) e, portanto, deve ser administrada por via endovenosa. A dose recomendada para o AmB-D é de 1mg/kg/dia, administrado por 20 a 30 dias, porém um estudo na Índia mostrou uma taxa de cura de 96% com uma dose de 0,75 mg/kg/dia, durante 15 dias (BRASIL, 2017). O desoxicolato de sódio é hemolítico e a formulação convencional é altamente nefrotóxica. Formulações lipídicas que surgiram na década 1990 apresentavam objetivo de reduzir essa nefrotoxicidade (BRAGA, 2019).

Existem três preparações lipídicas disponíveis comercialmente: AmBisome®: preparação lipossômica constituída de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) e AmB (AmBisome®); Abelcet®, ABLC: complexo lipídico constituído de diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) (Abelcet®); ABCD: dispersão coloidal de AmB em sulfato de colesterila sódica (Amphocil®) (GRAY, 2012; VYAS; GUPTA, 2006). Todas essas formulações apresentam eficácia semelhante, são de uso intravenoso e diferem quanto à forma, tamanho, estrutura, composição e conteúdo de AmB (GOTO; LINDOSO, 2010). A forma lipossomal da AmB permite que medicamento atinja níveis plasmáticos mais elevados que o AmB-D e com menor toxicidade (LEMKE et al., 2005; WHO, 2010).

O AmBisome® é a formulação comercial significativamente menos tóxica do que as outras formulações, pois a AmB se ancora fortemente na bicamada lipídica devido a interações favoráveis com os lipídeos ao redor. Devido a essa forte associação a AmB não é liberada prontamente quando entra na circulação sanguínea, modificando sua biodistribuição, levando a uma redução na sua captação pelas células renais, e, assim, reduzindo a toxicidade (GUPTA, 2006; BRAGA, 2019; VYAS). Na formulação de referência, o Fungizone®, a AmB está na forma de oligômeros (forma solúvel em água auto-associada), que é a forma mais tóxica (TORRADO et al., 2008).

Até 2013 o MS recomendava e disponibilizava como fármaco de segunda escolha a AmB-D para o tratamento das leishmanioses, principalmente os casos mais graves e não

responsivos. Entretanto, em meados de 2013, o MS ampliou a indicação de uso da AmB lipossomal para o tratamento de pacientes diagnosticados com LV. Essa medida foi adotada visando a redução dos efeitos colaterais causados pelo tratamento convencional e também para garantir o acesso de um maior número de pessoas ao medicamento, que é ofertado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Essa mudança foi devido a observação de uma maior toxicidade do desoxicolato, até então utilizado como segunda escolha para o tratamento, quando comparado à AmB lipossomal e ao AM (BRASIL, 2013). A AmB lipossomal já era utilizada para o tratamento das leishmanioses, porém com indicação para apenas três grupos prioritários: (i) pacientes com idade acima dos 50 anos, (ii) pacientes com insuficiência renal e (iii) transplantados cardíacos, renais e hepático. MS também estendeu a indicação para pacientes com LV menores de 1 ano de idade; hipersensibilidade ou falha terapêutica ao AM ou a outros medicamentos utilizados para o tratamento da LV; coinfeção HIV/L.(L) *infantum*; comorbidades ou uso de medicamentos que comprometem a imunidade e gestantes. Com exceção das situações citadas acima, o MS ainda recomenda e fornece gratuitamente o AM como primeira escolha para o tratamento da LV (BRASIL, 2013).

Os principais efeitos adversos relacionados AmB são febre, cefaléia, náusea, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar. Pacientes em tratamento com AmB-D também podem apresentar anorexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, comprometimento da função renal, e distúrbios de comportamento (BRASIL, 2017).

A AmB apresenta um efeito vasoconstritor nas arteríolas renais aferentes que resulta na redução do fluxo sanguíneo glomerular e tubular, sendo considerado um fármaco potencialmente nefrotóxico. A diminuição da filtração glomerular provoca alterações de eletrólitos, acarretando à perda de potássio, retenção de íon hidrogênio, acidose tubular renal e hipomagnesemia. A ação nefrotóxica da anfotericina pode provocar anemia, em decorrência da inibição da síntese de eritropoetina, ou por ação direta sobre a medula óssea (CATÁLAN; MONTEJO, 2006).

Devido ao recrudescimento da endemia, a alta taxa de morbimortalidade, por afetar desproporcionalmente populações pobres e marginalizadas, aliado ao surgimento de parasitos resistentes e ao caráter oportunista da doença em pacientes com HIV/AIDS e outras condições imunossupressoras, a OMS considera o controle da LV como prioridade máxima (WHO, 2010). Por isso, tem realizado importante esforço ao longo das últimas décadas, incentivando e financiando estudos que viabilizem avanços nas áreas de diagnóstico, controle e tratamento, quer seja para descoberta de novos produtos, fármacos e formulações, vacinas ou técnicas,

quer seja pela melhora na qualidade das metodologias diagnósticas e de tratamento já existentes (WHO, 2017).

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

### **1.7.1. Lipossomas: propriedades e aplicação no 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. Tipicamente, o diâmetro médio dos lipossomas varia de 20 a 2000nm. Uma grande vantagem dos lipossomas, com 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 fármacos lipofílicos. Além disso, são sistemas altamente versáteis, cujo 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).

Como exemplo dessa versatilidade, alguns autores relataram que, ao adicionar em lipídeo com cabeça polar constituída de polímero de etileno glicol (PEG) na membrana das vesículas de formulações lipossomais, essa formulação permaneceria por um período maior na circulação sanguínea. Foi dado o nome de lipossomas furtivos, peguilados ou estabilizados estericamente, a esse tipo de formulação (ALLEN; HANSEN, 1991). A incorporação do PEG na formulação leva a uma redução na opsonização das vesículas e menor velocidade de captação pelos macrófagos do SMF da medula óssea, fígado e baço, promovendo a circulação prolongada da formulação e aumentando os sítios de ligação nos locais da inflamação/infecção (ALLEN; HANSEN, 1991; FRÉZARD et al., 2005).

A tendência natural dos lipossomas serem fagocitados pelos macrófagos do fígado, do baço e da medula óssea torna esse sistema nanoestruturado ideal para o direcionamento de fármacos para os locais onde há maior densidade parasitária na LV (ALVING, 1986; FRÉZARD et al., 2005). Essa propriedade foi explorada no medicamento AmBisome®, formulação da AmB em lipossomas, usada com sucesso no tratamento de pacientes não responsivos às drogas antimoniais, sem relato de efeitos colaterais. A eficácia na faixa de 100% em pacientes imunocompetentes rendeu-lhe a aprovação pela agência reguladora americana “Food and Drug Administration – FDA” como a primeira apresentação à base de lipossomas a ser reconhecida para tratamento da LV (MEYERHOFF, 1999). Entretanto, na

dose terapêutica recomendada pelo MS para o tratamento da LV (3-4mg/kg/dia/5-7 dias), o elevado custo dessa formulação (estimado em cerca de R\$ 55000,00/paciente de 70kg), tornou inviável o seu uso em larga escala no Brasil (BRASIL, 2011).

A camada hidrofílica superficial destes polímeros aumenta o tempo de circulação dos lipossomas prevenindo o reconhecimento e conseqüente associação com as opsoninas no plasma, desse modo, inibindo o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente as células de Kupffer no fígado (NEEDHAM et al., 1992)

Na década de 70, foi relatado que, encapsulados em lipossomas, os antimoniais pentavalentes eram de 200 a 700 vezes mais eficazes que na forma livre, quando testados em modelos experimentais da LV (hamsters ou camundongos infectados com *Leishmania donovani*) (ALVING, 1986). Apesar desses resultados extremamente promissores, até hoje, nenhuma composição farmacêutica associando lipossomas com antimoniais chegou a ser comercializada. Este fato pode ser atribuído, pelo menos em parte, às dificuldades tecnológicas inerentes à obtenção de formulação estável de compostos hidrossolúveis, como os antimoniais, encapsulados em lipossomas.

Azevedo e colaboradores (2014) demonstraram que o AM em uma mistura de lipossomas convencional e peguulado apresentou resultados promissores quando comparados com AM livre, e que esta mistura foi capaz de promover uma maior redução da carga parasitaria na medula óssea, baço e fígado de camundongos experimentalmente infectados quando comparado com as formulações utilizadas sozinhas.

Diante da necessidade de melhoramento da quimioterapia convencional existente e da inexistência de uma formulação lipossomal de circulação prolongada contendo AmB para o tratamento da LV é de extrema relevância uma abordagem experimental que avalie a eficácia dessa formulação *in vivo* e *in vivo* como estratégia para o tratamento dessa importante doença.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A LV é considerada uma doença negligenciada e está frequentemente associada a más condições habitacionais, pobreza, imunossupressão e urbanização. Nos últimos anos, a doença se expandiu para diversas áreas urbanas até então livres desta parasitose, causando novas epidemias em locais endêmicos, provocando impacto e prejuízos na saúde pública. Com altas taxas de mortalidade, é a segunda parasitose que mais leva à óbito no mundo. Em razão disso, OMS considera o controle da LV como prioridade máxima, sendo a principal medida, o diagnóstico rápido e o tratamento imediato dos indivíduos doentes (WHO, 2019).

O arsenal de fármacos utilizados no tratamento da LV é limitado, sendo os fármacos de primeira escolha os derivados de antimoniais pentavalentes, como o AM, utilizados há mais de 70 anos. Em casos de resposta insatisfatória aos antimoniais, o fármaco utilizado é a AmB. Porém esses medicamentos apresentam diversas limitações, como elevada toxicidade e seleção de parasitos resistentes. A OMS tem realizado importante esforço ao longo das últimas décadas, incentivando e financiando estudos que viabilizem avanços na área de tratamento, quer seja para descoberta de novos produtos, fármacos e formulações, quer seja pela melhora das metodologias de tratamento já existentes (WHO, 2017; WHO, 2019).

Não foram registrados na literatura, até o momento, ensaios que utilizam formulações lipossomais de circulação prolongada contendo AmB para o tratamento da LV. Sendo assim o presente trabalho propõe determinar a eficácia de uma nova estratégia terapêutica para o tratamento dessa importante doença, fundamentado em sistema entregador de fármaco leishmanicida, composto por formulações lipossomais de circulação prolongada contendo AmB.

Os lipossomas de circulação prolongada promovem o direcionamento mais eficaz de fármacos leishmanicidas para todos os órgãos e locais onde há uma maior presença de parasitos, enquanto lipossomas convencionais exercem o direcionamento do fármaco para o fígado. Além disso, o uso dessas formulações possibilita a administração de doses terapêuticas inferiores do que as utilizadas convencionalmente, e a toxicidade dos medicamentos é reduzida, o que pode levar a um menor risco de seleção de parasitos resistentes aos fármacos, sendo este um dos principais problemas relacionados ao tratamento das leishmanioses.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Preparar, caracterizar e avaliar a eficácia terapêutica, *in vitro* e *in vivo*, da AmB em formulação lipossomal nanoestruturada de ação prolongada para o tratamento da LV.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

- Preparar e caracterizar as formulações lipossomais convencional contendo AmB (LAmB-Conv) e peguilhadas contendo AmB (LAmB-PEG);
- Avaliar a citotoxicidade dessas formulações por testes *in vitro* em macrófagos RAW264.7.

- Avaliar a atividade leishmanicida das formulações por testes *in vitro* em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*;
- Avaliar a toxicidade dessas formulações *in vivo*, utilizando modelo murino (camundongos BALB/c);
- Avaliar a eficácia dessas formulações em testes *in vivo*, utilizando modelo experimental de LV.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Preparo e caracterização das formulações

O preparo e caracterização das formulações lipossomais avaliadas nesse trabalho foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a supervisão do professor Frédéric Jean Geoges Frézard.

#### 4.1.1. Preparo dos Lipossomas pegulados e convencionais contendo AmB

O preparo das formulações foi realizado de acordo com o método de desidratação – reidratação das vesículas, como descrito previamente (KIRBY; GREGORIADIS, 1984), utilizando os fosfolídeos diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG 2000) (Lipoid, Alemanha), e colesterol (COL) (Sigma-Aldrich, EUA).

Para o preparo das formulações LAmB-Conv e LAmB-PEG, foram utilizados os lípídeos DSPC:COL:DPPG na razão molar de 5:2,5:2 e DSPC:COL:DPPG:DSPE-PEG 2000 na razão molar de 5:2,5:2:0,5 respectivamente.

Sucintamente, os lípídeos citados acima foram solubilizados em clorofórmio em balão de fundo redondo que posteriormente foi levado ao rotavapor (banho à 60°C) para evaporação do solvente e formação do filme lipídico. Este, foi hidratado com solução de água deionizada por 1h à 60°C e passou, logo em seguida, por ciclos de congelamento-descongelamento (5x). Em seguida, as vesículas foram submetidas a um processo de calibração de tamanho, chamado de extrusão que consiste em filtração repetida a 60°C através de membrana de policarbonato com poro de 200 e 100 nm (5x cada), usando uma extrusora 10-mL Lipex biomembrane Inc. (Vancouver, Canada). A suspensão de lipossomas calibrados foi misturada à suspensão alcalina de AmB (0,1M de NaOH) ao abrigo da luz e aquecida por 2 min. Logo

após, o pH foi reduzido para 6,5 com solução de HEPES/HCl 0,1M acrescida de sacarose 180g/L na relação sacarose/lípido 3:1 (m/m). A mistura resultante foi então congelada em nitrogênio líquido e liofilizada (Liofilizador L101, Liotop, Brasil).

Os lipossomas liofilizados permaneceram armazenados em -20°C até o uso. Os líofílos foram então reidratados em água deionizada, a temperatura de 60°C por 5 minutos sob agitação mecânica, de modo a se obter uma suspensão de lipossomas com concentração de AmB 5mg/mL.

Alíquotas das suspensões finais de lipossomas foram utilizadas para análises de tamanho e do índice de polidispersão (IP), ambas através de espectroscopia de correlação de fótons (DLS), a 25°C com ângulo de espalhamento de 90°. O potencial zeta foi avaliado também por DLS associado à mobilidade eletroforética, a um ângulo de 90° (Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments LTD, Reino Unido). Para as análises, usou-se 0,01mL da amostra (formulação) para 0,99mL de PBS (NaCl 150mM, fosfato 10mM, pH 7,2).

#### **4.1.2 Avaliação da taxa de encapsulação**

##### **4.1.2.1 Seletividade do método**

Para avaliar a taxa de encapsulação da AmB, foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (DAD) desenvolvido por Chang e colaboradores (2011) com pequenas modificações. Esta avaliação foi realizada na Faculdade de Farmácia da UFMG, no laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em colaboração com o doutorando Gabriel Borges e Guilherme Santos Ramos sob supervisão do Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira.

Inicialmente foi avaliado o método cromatográfico proposto era seletivo para a quantificação da AmB nas formulações lipossomais. Para isto foram analisados os cromatogramas da solução padrão de AmB, formulações lipossomais brancas (sem AmB) e das formulações contendo a AmB. Os cromatogramas obtidos foram comparados, avaliando-se a presença de picos interferentes, no mesmo tempo de retenção da AmB, no comprimento de onda de absorção de 405 nm. As amostras das formulações foram preparadas da seguinte forma: os líofílos foram ressuspensos em água ultrapura e, subsequentemente, em PBS. Após isso foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico foi adicionado à suspensão lipossomal em um balão volumétrico de 5 mL que teve seu volume completado com metanol. O álcool isopropílico tem a função de desestruturar os lipossomas, liberando a AmB e o metanol tem a função de solubilizar a AmB. Uma alíquota de 140 µL dessa solução foi transferida a um

balão de volumétrico de 5 mL que teve seu volume completado com fase móvel. As soluções foram filtradas em filtro de poro 0,45 $\mu$ m e foram levadas para análise no CLAE/DAD.

#### 4.1.2.2 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da AmB

Para a determinação do teor de AmB em ambas as formulações foi feita a comparação das áreas sob o pico de absorção de AmB obtidas a partir da solução padrão de AmB e das soluções lipossomais LAmB-Conv e LAmB-PEG todas na mesma concentração teórica de 1,4 $\mu$ g/mL.

Para o preparo da solução padrão de AmB, 10 mg de AmB pura foram pesados e diluídos para um volume de 10 mL com DMSO em balão volumétrico. Após, 1 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, completado com metanol. Por fim, 70  $\mu$ L dessa solução foi transferida a um balão volumétrico de 5 mL que teve seu volume completado com fase móvel (FM). A solução foi filtrada em filtro de poro 0,45  $\mu$ m e foi levada para análise no CLAE/DAD. Para determinar o teor total (TT) da AmB nos lipossomas carregados, ou seja, a concentração de AmB que está na formulação, procedeu-se da seguinte forma: o liófilo foi ressuscitado em água ultrapura e, subsequentemente, em PBS. Após, 500  $\mu$ L de álcool isopropílico foi adicionado à suspensão lipossomal em um balão volumétrico de 5 mL que teve seu volume completado com metanol. Uma alíquota de 140  $\mu$ L dessa solução foi transferida a um balão volumétrico de 5 mL que teve seu volume completado com FM. A solução foi filtrada em filtro de poro 0,45 $\mu$ m e foi levada para análise no CLAE/DAD. O TT de AmB nos lipossomas foi calculado pela seguinte fórmula: Sendo o TT (%):

$$\frac{\text{Área do pico da AmB a partir da solução LAmB-Conv ou LAmB-PEG} \times 100}{\text{Área do pico de AmB a partir da solução padrão de AmB}}$$

Para determinar a concentração de AmB nos lipossomas filtrados também chamada de eficiência de encapsulação (EE), ou seja, a porcentagem de AmB nas formulações que está na forma encapsulada, procedeu-se da seguinte forma: o liófilo foi ressuscitado em água ultrapura e, subsequentemente, em PBS. A suspensão obtida foi filtrada em filtro de poro 0,45 $\mu$ m e, a ela, foi adicionado 500  $\mu$ L de álcool isopropílico em um balão volumétrico de 5 mL que teve seu volume completado com metanol. Uma alíquota de 140  $\mu$ L dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL que teve seu volume completado com FM. A solução foi filtrada em filtro de tamanho de poro 0,45 $\mu$ m e foi levada para análise no

CLAE/DAD. Sendo assim, a EE em ambas as formulações foi determinada pelo mesmo método (CLAE/DAD) comparando-se as áreas sob o pico de absorção da AmB obtidas de soluções de LAmB-Conv ou LAmB-PEG filtradas e não filtradas na mesma concentração teórica de 1,4ug/mL, de acordo com a fórmula abaixo. Sendo assim, a EE (%):

$$\frac{\text{Área do pico de AmB a partir da solução LAmB-Conv ou LAmB-PEG filtrada} \times 100}{\text{Área do pico de AmB a partir da solução de LAmB-Conv ou LAmB-PEG filtrada}}$$

#### 4.2. Parasitos

Para a realização dos ensaios foi utilizada a cepa *Leishmania (L.) infantum* (MCAN/BR/2002/BH401) proveniente do criobanco de células e parasitos do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* - Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM-UFU), coordenado pelo professor Dr. Sydnei Magno da Silva.

#### 4.3. Animais

Todos os procedimentos de manipulação dos animais estão em acordo com os princípios éticos de experimentação animal, e foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da UFU - CEUA/UFU (Protocolo CEUA/UFU nº 001/2019) (ANEXO 1).

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, provenientes da Rede de Biotérios e Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR/UFU).

Os animais foram mantidos no biotério do REBIR/UFU, sob condições adequadas de manejo técnico, com água e alimentação *ad libitum*, de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Medicina Veterinária, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, e *Principles of Laboratory Animal Care* – NIH/EUA (GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 2011).

#### 4.4. Ensaios *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do ICBIM/UFU, coordenado pelo prof. Dr. Sydnei Magno da Silva.

#### 4.4.1. Ensaio de citotoxicidade das formulações sobre linhagem de macrófagos/monócitos RAW 264.7

A linhagem comercial de macrófagos/monócitos RAW 264.7 (Criobanco Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*), foi mantida em garrafas plásticas de cultura celular de 25cm<sup>2</sup> em meio RPMI 1640 completo (Sigma Aldrich Inc., EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado 10% (SFB – Life Technologies, EUA), L-glutamina (Sigma-Aldrich), penicilina (Sigma-Aldrich) e estreptomicina (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade (CO<sub>2</sub> Incubator MCO-19IAUV-PA, Panasonic Corp., Japão). Subculturas (repiques) foram realizados a cada três dias, quando foi utilizada a contagem das células viáveis pela metodologia de exclusão por corante vital azul de tripan (0,4% p/v).

As células foram então incubadas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 4h) em placa de 96 poços, em concentração ajustada para 5x10<sup>5</sup> macrófagos/poço em meio RPMI completo, para aderência dos macrófagos aos poços. Após o período de incubação os poços foram lavados com meio RPMI aquecido a 37°C, para remover possíveis células que não aderiram a placa, e esgotados (TEMPONE et al., 2004). Os macrófagos aderidos à placa foram incubados na presença das formulações LAmB-Conv e LAmB-PEG em concentrações de AmB correspondentes a 1000µg/mL até 15,625µg/mL, diluídas em um volume final de 100µL de meio RPMI completo. Como controle do experimento, macrófagos aderidos foram incubados na presença apenas de meio completo (controle negativo) e incubados com AmB-D (controle positivo), nas mesmas concentrações das formulações lipossomais. As culturas de macrófagos permaneceram incubadas com às formulações durante 24h (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após o período de incubação, os poços foram esgotados e foi adicionado 28µL da solução MTT (Sigma, USA) a 2mg/mL. A seguir as placas foram incubadas por 1h30min (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). A reação foi parada com 130µL de DMSO/poço, que solubiliza os cristais de formazan gerados, e em seguida as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570nm (MOSMAN, 1983; DUTTA et al., 2005).

Cada experimento foi repetido três vezes, e a densidade ótica final foi gerada pelo valor da média ± desvio padrão das leituras das amostras, realizadas em triplicata nas placas, subtraído do valor médio da densidade ótica dos poços contendo somente macrófagos incubados com meio completo (considerado 100% de viabilidade).

A concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de MTT, calculada por análise de regressão a partir dos dados obtidos em cada experimento.

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

A concentração inibidora ( $CI_{50}$ ) das formulações para promastigotas de *L. infantum* foi avaliada por ensaio de viabilidade celular à base de resazurina (CORRAL et al., 2013). Promastigotas em fase logarítmica de crescimento ( $2,5 \times 10^5$  parasitos/poços) foram semeadas em placas de 96 poços em meio  $\alpha$ -MEM completo (GIBCO BRL, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado 10% (SFB — Life Technologies, EUA), L-glutamina (Sigma-Aldrich), penicilina (Sigma-Aldrich) e estreptomicina (Sigma-Aldrich) e incubadas a 26°C em atmosfera de 5% de  $CO_2$  ( $CO_2$  Incubator MCO-19IAUV-PA, Panasonic Corp., Japão). As formulações LAmB-Cov e LAmB-PEG, e AmB-D foram diluídas em meio  $\alpha$ -MEM completo em concentrações correspondentes de AmB de 500ng/mL até 7.8125ng/mL. Parasitos não tratados foram utilizados para comparação da viabilidade (controle negativo). As formulações ficaram em contato com os parasitos durante 24h. Após esse período foi adicionado solução de resazurina a 0,15mg/mL (22 $\mu$ L/poço) (Sigma-Aldrich Inc., EUA) nos poços e as placas foram incubadas durante 4h a 26°C com uma atmosfera de 5% de  $CO_2$ . Em seguida, a intensidade de fluorescência (Spectramax M2, Molecular Devices LLC, EUA) foi determinada utilizando os seguintes comprimentos de ondas: 550 nm de excitação e 590 nm de emissão. A intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias foi utilizada para o cálculo da viabilidade celular. Todos os compostos foram testados em triplicata para cada concentração e foram realizados três experimentos independentes.

A concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de resazurina em relação ao controle (parasitos incubados com RPMI 1640 completo, considerado 100% de viabilidade), calculada por análise de regressão “Dynamic Fit Wizard”, utilizando o programa Sigma Plot 10.0 (Systat Software Inc., EUA).

#### **4.4.3. Índice de seletividade *in vitro***

O índice de seletividade (IS) é determinado pela razão  $CC_{50}/IC_{50}$ . As amostras que apresentam valor de IS maior que 10 são consideradas eficazes e com ação seletiva para *Leishmania (L.) infantum* (BÉZIVIN et al., 2003).

#### **4.4.4. Exposição dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* as formulações lipossomais contendo AmB**

O ensaio de avaliação da eficácia dos lipossomas em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* foi realizado com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (fêmeas, de

6 a 8 semanas). Por meio de injeção intraperitoneal (IP) contendo 2mL de amido 2% p/v (Sigma-Aldrich Inc., EUA) os macrófagos peritoneais foram estimulados e após 24h, os camundongos foram eutanasiados. O lavado da cavidade peritoneal (com meio RPMI 1640 incompleto) foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos a 4°C (Centrifuga HERMLE, modelo 2323 K, HERMLE LaborThechnik, Alemanha), o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspendido em meio RPMI 1640 completo (ZHANG et al., 2008). As células foram quantificadas em câmara hemocitométrica com o auxílio do corante vital azul de tripan (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,4% p/v.

Para a realização desse ensaio,  $5 \times 10^5$  macrófagos peritoneais foram incubados por 4h (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) em 500µL de meio RPMI 1640 completo (Sigma Aldrich Inc., EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado 10% (SFB – Life Technologies, EUA), L-glutamina (Sigma-Aldrich), penicilina (Sigma-Aldrich) e estreptomicina (Sigma-Aldrich), em placas de 24 poços, contendo uma lamínula estéril/poço. Após esse período, promastigotas de *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2002/BH401), em fase estacionária de crescimento (abundante em formas metacíclicas – infectantes) foram adicionado aos poços na proporção de 10 promastigotas/macrófago/poço/500 µL e a placa foi incubada novamente (26°C por 4h). Em seguida foram realizadas lavagens dos poços com meio RPMI completo para remoção de promastigotas não fagocitadas e células não aderidas (ESLAMI; TANNER, 1994) e as placas foram incubadas novamente por 8h a 37°C.

As formulações LAmB-Conv e LAmB-PEG, foram diluídas em meio RPMI 1640 completo, na concentração inicial de 250ng/ml até 15,6ng/mL, de forma seriada. O fármaco referência AmB-D, foi utilizado na concentração de 500ng/mL até 31,25ng/mL. As concentrações das formulações e do fármaco de referência utilizadas para esse experimento foram baseadas nos valores de IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>.

Após a infecção dos macrófagos, a placa foi lavada com o meio e, a seguir, as formulações e a AmB-D foram adicionada sobre as lamínulas com macrófagos infectados com amastigotas, em volume final de 500µL por poço. Macrófagos não infectados foram expostos as mesmas concentrações das drogas, como controle do experimento. Os macrófagos infectados com amastigotas foram incubados por 48h (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) com as formulações e o fármaco de referência.

Após as incubações, as lamínulas foram retiradas dos poços, coradas por panótico rápido (Panótico rápido, Laborelin, Brasil), montadas em lâminas com o auxílio de bálsamo do Canadá (Entellan, Merck, Alemanha), e analisadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100X).

A taxa de infecção dos macrófagos foi determinada de acordo com a razão entre o número de macrófagos infectados e o número de não infectados, após contagem de 300 macrófagos por lamínula, em triplicata. As médias das taxas de infecção de macrófagos, estabelecidas na presença de cada uma das formulações e fármacos referência, foram comparadas com a taxa de infecção média dos controles sem as drogas.

#### **4.5. Ensaio de toxicidade das formulações em camundongos BALB/c**

Para a avaliação da toxicidade das formulações, camundongos BALB/c fêmeas de 6 semanas de idade e peso variando entre 20 – 25g, foram tratadas de acordo com a seguinte proposta terapêutica:

- **Grupo 1** – Seis animais que receberam, por via intraperitoneal (IP), duas doses da formulação LAmB-Conv (5mg/kg), com intervalo de 96h entre cada aplicação;
- **Grupo 2** – Seis animais que receberam, por via IP, duas doses da formulação LAmB-PEG (5mg/kg), com intervalo de 96h entre cada aplicação;
- **Grupo 3** – Seis animais que receberam, por via IP, dez doses da AmB-D (5mg/kg) com intervalo de 24h entre cada aplicação;
- **Grupo 4** – Trinta e seis animais que não receberam nenhum tratamento (controle: valores de referência).

Após o tratamento (96h após aplicação das formulações e 24h após a aplicação da AmB-D), alíquotas de plasma dos grupos tratados e do grupo sem tratamento foram encaminhados ao Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL-Universidade Federal de Minas Gerais), coordenado pelo Prof. Wagner Luiz Tafuri, para a realização dos seguintes exames: avaliação da função renal, pela determinação dos níveis séricos de uréia e creatinina; para a avaliação da função hepática pela determinação dos níveis de transaminase pirúvica (TGP), transaminase oxalacética (TGO), proteínas totais e albumina. Os ensaios de bioquímica séricas foram realizados em analisador bioquímico semiautomático (Labquest, Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), utilizando kits comerciais para a determinação das funções hepática e renal.

#### **4.6. Testes de eficácia em modelo murino nas doses 5mg/kg e 10 mg/kg**

Para os ensaios *in vivo* de eficácia terapêutica das formulações, foram realizados dois protocolos terapêuticos com diferentes doses das formulações, a fim de compará-los. Esses protocolos foram realizados sob as mesmas condições, porém em momentos diferentes.

A dose administrada das formulações lipossomais foi baseada de acordo com a literatura (KHODABANDEH et al., 2019; MAES et al., 2004; SIFONTES-RODRÍGUEZ et al., 2015; WIJNANT, 2018).

Para esses ensaios foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, 6 semanas de idade e peso variando entre 20 – 25g. Os animais foram infectados com  $2 \times 10^7$  promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2002/BH401), por via IP (dia 0).

Vinte e cinco dias após a infecção (dia 26), os animais experimentalmente infectados foram distribuídos aleatoriamente em grupos, de acordo com a proposta terapêutica, conforme descrito a seguir:

#### **Protocolo terapêutico n°1:**

- **Grupo 1** – Seis animais que receberam, por via IP, duas doses da formulação LAmB-Conv (5mg/kg), com intervalo de 96h entre cada aplicação;
- **Grupo 2** – Seis animais que receberam, por via IP, duas doses da formulação LAmB-PEG (5mg/kg), com intervalo de 96h entre cada aplicação;
- **Grupo 3** – Seis animais que receberam, por via IP, dez doses da AmB-D (5mg/kg) com intervalo de 24h entre cada aplicação;
- **Grupo 4** – Seis animais que receberam por via IP, solução salina estéril (PBS), a cada 24h, durante dez dias (controle).

#### **Protocolo terapêutico n°2:**

- **Grupo 1** – Seis animais que receberam, por via IP, duas doses da formulação LAmB-Conv (10mg/kg), com intervalo de 96h entre cada aplicação;
- **Grupo 2** – Seis animais que receberam, por via IP, duas doses da formulação LAmB-PEG (10mg/kg), com intervalo de 96h entre cada aplicação;
- **Grupo 3** – Seis animais que receberam, por via IP, dez doses da AmB-D (5mg/kg) com intervalo de 24h entre cada aplicação;
- **Grupo 4** – Seis animais que receberam por via IP, solução salina estéril (PBS), a cada 24h, durante dez dias (controle).

Durante o tratamento os animais foram mantidos no REBIR/UFU, onde receberam água e alimentação balanceada *ad libitum*. Ao longo do experimento os parâmetros ingestão de alimento e água, comportamento, aspecto de pelagem e mucosas, além do peso dos animais, foram monitorados. Após o tratamento completo (dia 35) os animais foram eutanasiados com sobredose dos anestésicos quetamina 300 mg/kg + xilazina 30 mg/kg.

#### 4.7. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Fígado e baço foram coletados, pesados e transferidos para tubos de microcentrífuga estéreis para a determinação da carga parasitária por qPCR (PCR quantitativo em tempo real). As extrações de DNA das amostras foram realizadas utilizando o kit “Macherey Nagel Ink-Nucleo Spin Tissue® (DNeasy Blood & Tissue Kit®)” (Quiagen Inc., EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

As reações da qPCR foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), em triplicata e processadas em termociclador (Applied Biosystems, EUA). Para determinar as cargas parasitárias foram utilizados iniciadores (direto 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3' e reverso 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3') que amplificam um fragmento de 90pb do gene da DNA polimerase de *L. (L.) infantum* (GenBank número de acesso AF009147) (BRETAGNE et al., 2001). As reações foram realizadas em 25µL de volume final contendo 200nM de cada iniciador, 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), e 5µL de amostra. O número de cópias de DNA de *L. infantum* em cada amostra foi determinado a partir de regressão linear, na comparação com uma curva padrão, gerada com quantidades conhecidas de plasmídeos (Promega, EUA) contendo o fragmento de 90pb do gene da DNA polimerase de *L. (L.) infantum*. O procedimento descrito acima também foi realizado para a amplificação e quantificação do gene da  $\beta$ -actina, que é expresso de forma constitutiva em todas as células, e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade do DNA das amostras, além de ser utilizado como normalizador das reações (SILVA et al., 2012).

#### 4.7. Análise estatística

Os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* 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 Sigma Plot 10.0 (Systat Software Inc., EUA).

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

Para calcular os valores de CI<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>, 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, na análise dos parâmetros bioquímicos no teste de toxicidade e na análise da carga parasitária foram procuradas diferenças entre as formulações utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn's, para identificar diferenças estatísticas entre um grupo e outro.

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

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização das formulações LamB-Conv e LAmB-PEG

Após o preparo, as formulações LamB-Conv e LAmB-PEG apresentaram características de sistemas nanoestruturados monodispersos, com diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas reduzido (inferior a 200nm), índice de polidispersão menor que 0,3 e potencial zeta inferior que -30mV.

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

**Tabela 1** – Caracterização dos lipossomas convencionais contendo AmB (LAmB-Conv) e lipossomas peguilados contendo AmB (LAmB-PEG)

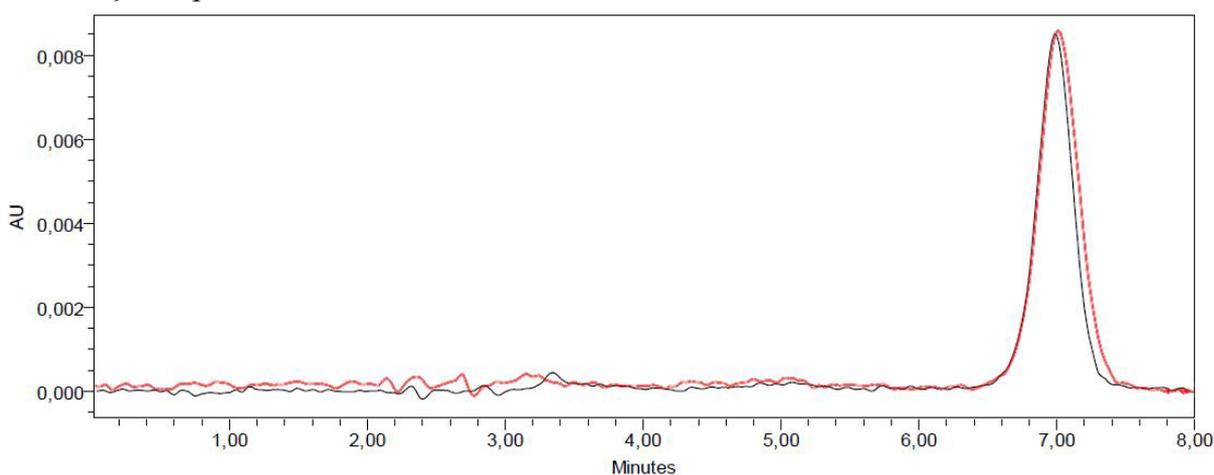
Características*					
Lipossomas	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)	Teor total (%)
<b>LAmB-Conv</b>	158±10,2	0,18±0,02	-21±1,2	65,1±11,1	43,8±21,1
<b>LAmB-PEG</b>	177±8,2	0,20±0,06	-6±1,9	76,4±3,4	44,4±18,9

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

A figura 5 apresenta a estabilidade química da AmB nas formulações e a AmB de referência (padrão), avaliada através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (DAD). Os cromatogramas obtidos foram comparados, avaliando-se a presença de picos interferentes, no mesmo tempo de retenção da AmB, no comprimento de onda de absorção de 405 nm. O método cromatográfico proposto foi seletivo para a quantificação da AmB nas formulações lipossomais, ou seja, sua capacidade de separar o fármaco dos outros componentes das formulações e de suas

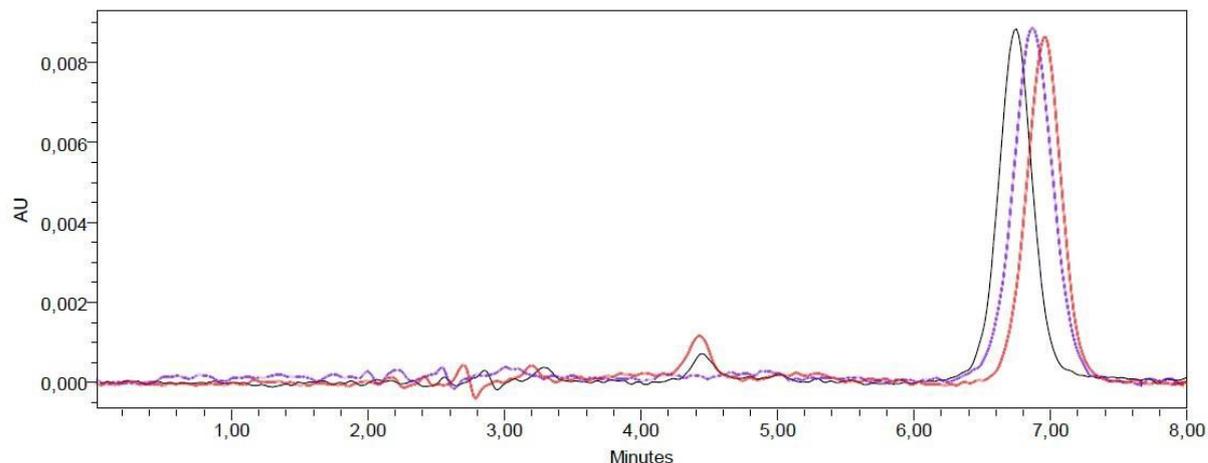
impurezas. Pode-se observar que não houve degradação da AmB durante o preparo das formulações e provavelmente ao longo do tempo.

**Figura 5** – Comparação dos perfis cromatográficos para avaliação da estabilidade química da AmB utilizada nos lipossomas e da solução padrão de AmB. Cor vermelha representando solução padrão de AmB e cor preta representando a AmB utilizada para o preparo das formulações lipossomais.



Na figura 6 são mostrados os perfis cromatográficos em CLAE/DAD das formulações e da solução de AmB utilizada como padrão. O TT avalia se houve perda da AmB durante o processo de produção como resíduos de AmB que ficaram retidos na vidraria usada ou se houve degradação do fármaco. Para a determinação do teor de AmB em ambas as formulações foi feita a comparação das áreas sob o pico de absorção de AmB obtidas a partir da solução padrão de AmB e das formulações, sendo os picos observados para LAmB-Conv, LAmB-PEG e solução padrão de AmB semelhantes, indicando que não houve perda da AmB durante o processo de produção dos lipossomas.

**Figura 6** – Comparação dos perfis cromatográficos das formulações LAmB-Conv, LAmB-PEG e solução padrão de AmB. Cor vermelha representando solução padrão de AmB, cor preta representando a AmB encapsulada na formulação LAmB-Conv e cor azul representando a AmB encapsulada na formulação LAmB-PEG.



## 5.2. Ensaios *in vitro* das formulações LAmB-Conv e LAmB-PEG

Na tabela 2 observam-se os valores da concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ), determinados para macrófagos RAW 264.7; valores da concentração inibitória ( $CI_{50}$ ), definidos sobre as formas promastigotas de *L. (L.) infantum*; e o IS das formulações (razão  $CC_{50}/CI_{50}$ ).

**Tabela 2** – Valores de  $CC_{50}$ <sup>a</sup> determinados para macrófagos RAW 264.7, valores de  $CI_{50}$ <sup>b</sup> determinados para formas promastigotas de *Leishmania infantum* e índice de seletividade (IS)<sup>c</sup> após incubação por 24h com formulações testadas.

	$CC_{50}$ <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{50}$ <sup>b</sup> ( $\text{ng/mL}$ )	IS <sup>c</sup>
<b>AmB-D</b>	265,61 $\pm$ 30,363	38,305 $\pm$ 3,104	6.934,081
<b>LAmB-PEG</b>	328,55 $\pm$ 23,391	20,365 $\pm$ 1,859	16.133,071
<b>LAmB-Conv</b>	316,1 $\pm$ 8,626	25,215 $\pm$ 2,651	12.536,188

<sup>a</sup>  $CC_{50}$  – 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.

<sup>b</sup>  $CI_{50}$  – 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.

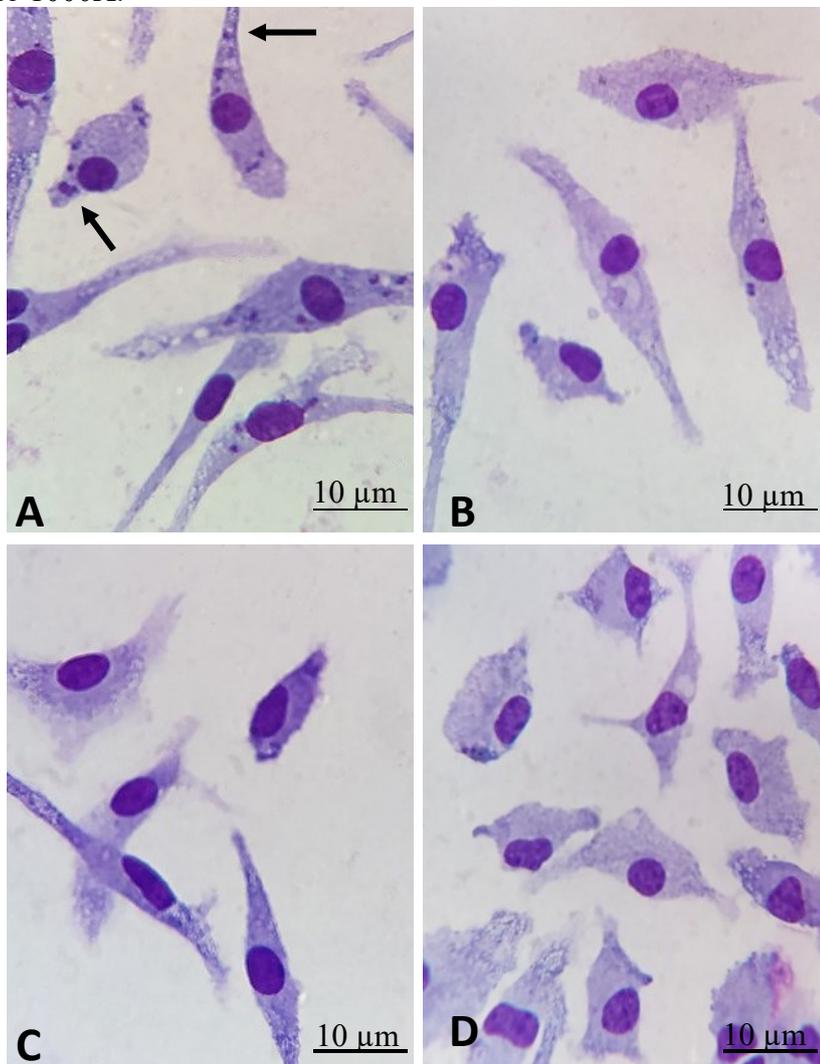
<sup>c</sup> Razão entre  $CC_{50}/CI_{50}$ .

Após a definição dos valores  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$ , a eficácia *in vitro* das formulações foi avaliada em amastigotas intracelulares. As concentrações que foram utilizadas nesse ensaio foram obtidas através do IS, representado pela razão entre  $CC_{50}/CI_{50}$ . Com base nisso a concentração inicial testada de LAmB-Conv e LAmB-PEG utilizada nos testes foi de 250ng/mL a 15,6ng/mL. Na figura 7 são apresentados os efeitos das formulações sobre os macrófagos peritoneais infectados com *L. infantum*, A análise por microscopia de luz sugere que os macrófagos tratados com LAmB-PEG (Figura 7C) e LAmB-Conv (Figura 7D) e o

fármaco de referência (Figura 7B) não sofreram alterações importantes na morfologia (tamanho médio alterado, vacuolização citoplasmática, núcleo com bordas irregulares, cromatina grosseira) quando expostos por 48h as diferentes concentrações das formulações.

Macrófagos infectados e sem nenhum tratamento (controle não tratado) apresentaram uma taxa de infecção de 62,75% (Figura 7A).

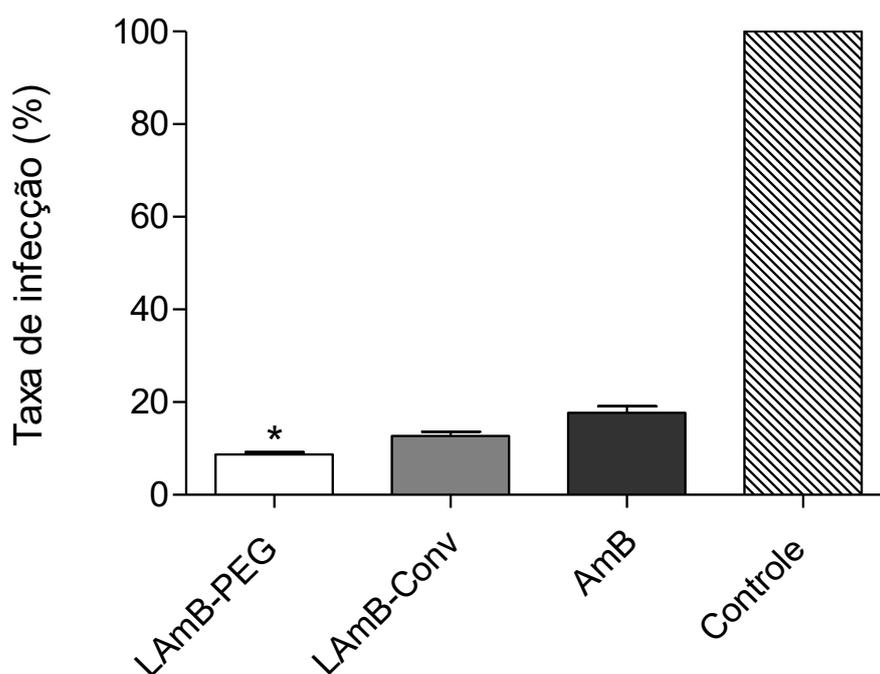
**Figura 7** – Ensaio de eficácia de LAmB-Conv, LAmB-PEG e AmB-D contra amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. (A) Macrófagos infectados sem exposição aos fármacos ou formulações durante 48h, setas indicam formas amastigotas; (B) macrófagos infectados expostos a 500ng/mL de AmB-D; (C) macrófagos infectados expostos a 250ng/mL da formulação LAmB-PEG durante 48h; (D) macrófagos infectados expostos a 250ng/mL da formulação LAmB-Conv durante 48h; Figura representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. Barra = 10µm; Aumento 1000X.



A figura 8 mostra que LAmB-PEG, LAmB-Conv e AmB-D foram eficazes, promovendo redução na carga parasitária dos macrófagos infectados com *L. infantum*, em todas as concentrações testadas. A  $CI_{50}$  do LAmB-PEG contra as amastigotas intracelulares

foi de 45,19ng/mL, do LAmB-Conv foi de 45,83ng/mL e 43,71ng/mL para a AmB-D. A formulação LAmB-PEG apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo sem tratamento (controle) ( $p < 0,05$ ), reduzindo significativamente a taxa de infecção dos macrófagos infectados com amastigotas.

**Figura 8** – Taxa de infecção de *Leishmania infantum* (BH401), em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. 250 ng/ml de AmB encapsulada em lipossomas de circulação prolongada (LAmB-PEG); 250 ng/ml de AmB encapsulada em lipossomas convencionais (LAmB-Conv); 500 ng/ml de AmB livre (AmB-D). Controle: macrófagos infectados sem tratamento. Tempo de exposição: 48h. Barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata para cada tempo. \* $p < 0,05$  estatisticamente significante em relação ao grupo controle, determinado pelos testes de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de comparação múltipla de Dunn's.



### 5.3. Avaliação da toxicidade das formulações LAmB-Conv e LAmB-PEG em modelo murino

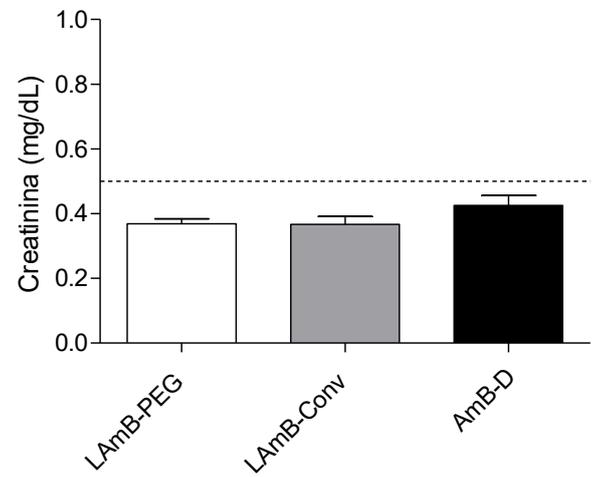
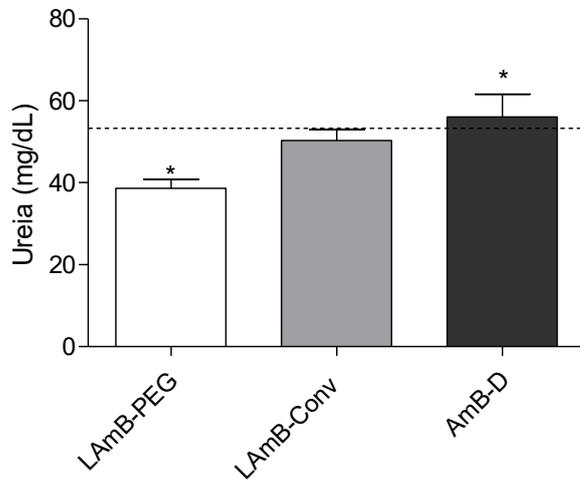
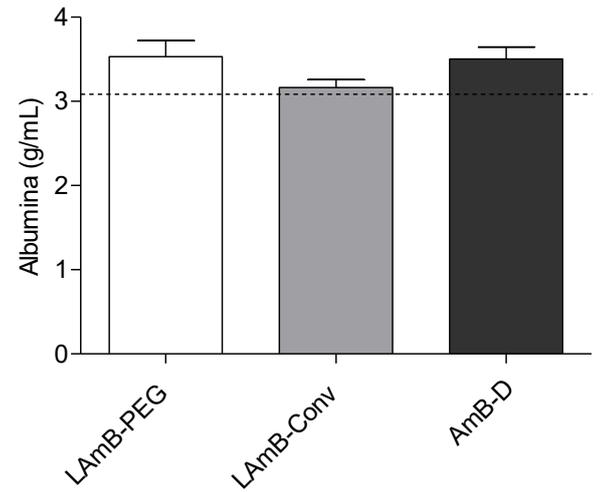
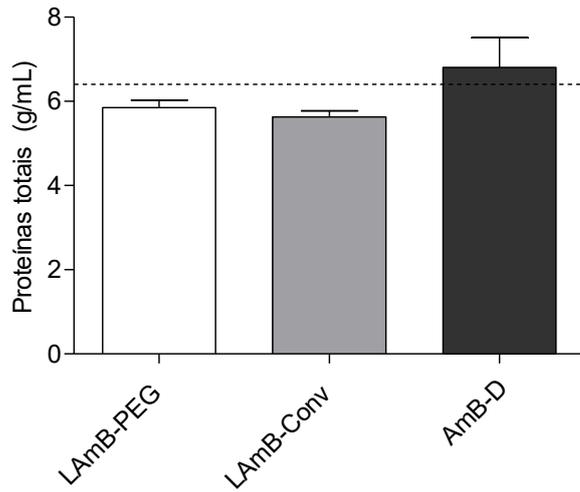
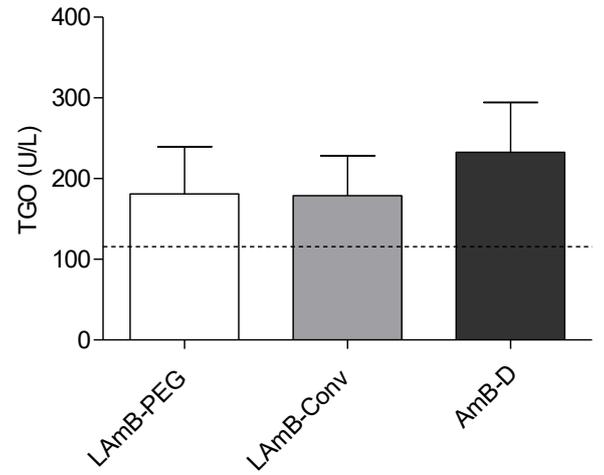
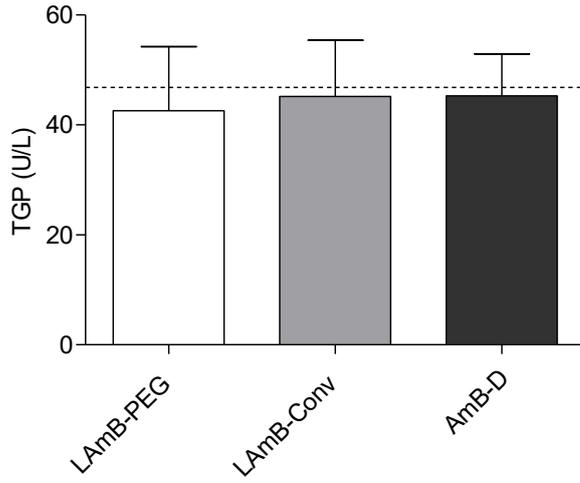
A toxicidade de LAmB-Conv, LAmB-PEG e AmB-D para camundongos BALB/c foi avaliada pela determinação dos parâmetros de função renal e hepática 96h após a aplicação das formulações lipossomais e 24h após a aplicação da AmB-D (Figura 9). De maneira geral as formulações foram bem toleradas pelos animais. Não foram observadas alterações no comportamento nem na ingestão de alimentos ou água, imediatamente após as administrações

até o momento da eutanásia. Não houve alteração significativa na média do peso dos animais, que passou de 21,5g no momento da infecção (dia 0) para 23,2g no dia da eutanásia (dia 8 para as formulações, dia 10 para AmB-D). Da mesma maneira, não houve diferenças significativas quando comparamos o peso médio dos animais de acordo com o grupo de tratamento e o controle.

Os níveis séricos de albumina dos grupos LAmB-PEG (3.533g/mL), LAmB-Conv (3.166g/mL), e AmB-D (3.5g/mL) apresentaram-se acima dos valores de referência (3.083g/mL) assim como os valores de TGO dos grupos tratados (180.933U/L; 178.733U/L; 232.533U/L, respectivamente) também demonstraram estar acima dos níveis de referência (115.959U/L).

Os valores de ureia dos animais tratados com as formulações LAmB-PEG (38.601mg/mL) e LAmB-Conv (50.309mg/mL) ficaram dentro dos níveis de referência (53.295mg/ml), sendo que somente o grupo tratado com AmB-D (56.0667mg/mL) apresentou valor elevado quando comparado ao valor de referência. Assim como os valores de proteínas totais, no grupo AmB-D (6.8g/mL) demonstrou valor acima da referência (6.4g/mL), enquanto que LAmB-PEG (38.601mg/mL) e LAmB-Conv (50.309mg/mL) permaneceram normais. Os níveis de TGP e creatinina tanto para os lipossomas quanto para a AmB-D estavam dentro dos níveis de referência (46.85U/L e 0.5mg/dL, respectivamente) para todos os fármacos avaliados.

**Figura 9** – Níveis séricos de transaminases pirúvicas e oxalacéticas (TGP e TGO), proteínas totais, albumina, ureia e creatinina determinados em camundongos BALB/c após a administração de duas doses da formulação lipossomal peguilhada contendo AmB (LAmB-PEG), duas doses da formulação lipossomal convencional contendo AmB (LAmB-Conv, e dez doses da AmB desoxicolato (AmB-D). (-----) Valor de referência determinado em amostras de camundongos BALB/c não tratados (n = 36). \*p<0,05; Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de comparação múltipla de Dunn's.



#### 5.4. Eficácia terapêutica *in vivo*

A carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum* foi avaliada após a aplicação de duas doses das formulações LAmB-Conv e LAmB-PEG nas doses de 5 e 10mg/kg, a cada 96h, e dez doses de AmB-D (5mg/kg) a cada 24h (grupo controle positivo).

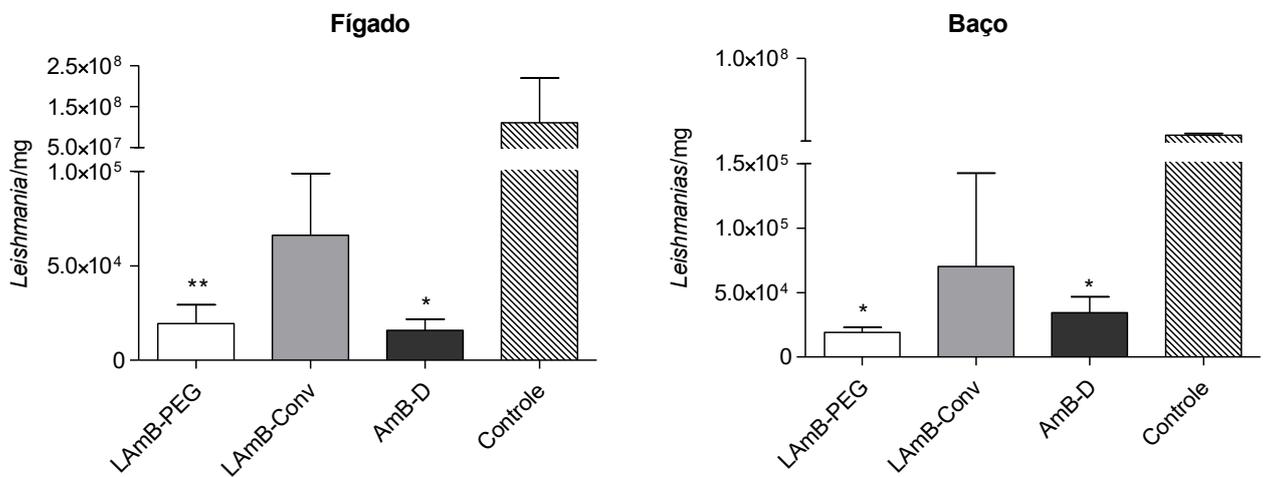
Houve boa tolerância ao regime terapêutico, não havendo mudança no comportamento, no padrão alimentar ou ingestão de água durante todo o tratamento. Após o término do tratamento com os esquemas terapêuticos propostos, foi realizada a eutanásia dos animais. Não foram observadas alterações macroscópicas importantes durante a coleta do baço e fígado dos animais tratados. As Figuras 10 e 11 mostram o impacto das terapias propostas sobre a carga parasitária no fígado e baço, determinada por qPCR.

A carga parasitária dos animais tratados com 5mg/kg é representada na figura 10. O procedimento de infecção foi eficiente, os animais do grupo controle tratado com PBS apresentaram alta carga parasitária no fígado ( $1,1 \times 10^8$  parasitos/mg de tecido) e baço ( $7,4 \times 10^6$  parasitos/mg de tecido). No fígado, os resultados demonstram que tanto os animais tratados com LAmB-PEG ( $p < 0,01$ ) quanto os tratados com AmB-D ( $p < 0,05$ ) apresentaram redução significativa da carga parasitária, quando comparados ao grupo controle. Os resultados sugerem que o LAmB-PEG foi capaz de induzir redução média da carga parasitária em 99,98%, sendo que o número médio de parasitos por miligrama do órgão ( $1,9 \times 10^4$ ) determinados nas amostras deste grupo, foi 5661,66 vezes menor que o determinado para o grupo controle sem tratamento. De maneira similar, nos animais que foram tratados com a AmB-D (controle positivo de tratamento) houve redução média da carga parasitária do fígado em 99,98% respectivamente, sendo 6983,53 vezes menos parasitos por miligrama de fígado ( $1,5 \times 10^4$ ) do que o grupo controle.

No baço os resultados foram semelhantes: o LAmB-PEG e AmB-D apresentaram diferença estatística quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,05$ ), induzindo redução média da carga parasitária em 99,75% e 99,54%, respectivamente, sendo que o número médio de parasitos por miligrama de tecido ( $1,9 \times 10^4$  e  $3,4 \times 10^4$  *Leishmania*/mg, respectivamente) nos animais destes grupos, foi 392,653 e 218,043 vezes menor, que o grupo controle sem tratamento.

O LAmB-Conv, na dose de 5mg/kg, não apresentou diferença estatística nos órgãos analisados, porém os animais tratados com essa formulação reduziram a carga parasitária em 99,06%, no baço, e 99,94% no fígado, com uma média de  $7,0 \times 10^4$  parasitos/mg e  $6,6 \times 10^4$  parasitos/mg de tecido respectivamente.

**Figura 10** – Carga parasitária de *Leishmania infantum* determinada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) em camundongos tratados com o protocolo terapêutico 1. Fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com  $10^7$  de promastigotas de *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH401), 96h após a administração de formulações lipossomais peguiliadas contendo AmB (LAmB-PEG/5mg/kg/IP/duas doses/96h), formulações lipossomais convencionais contendo AmB (LAmB-Conv/5mg/kg/IP/duas doses/96h). Grupo controle negativo: PBS; Grupo controle positivo: tratado com AmB desoxicolato (AmB-D) (5mg/kg/24h/IP/10 dias). \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$  estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn's. qPCR: Fígado:  $r = 0.983$ ; slope:  $-3.269$ ; Baço:  $r = 0.982$ ; slope:  $-3.294$ .

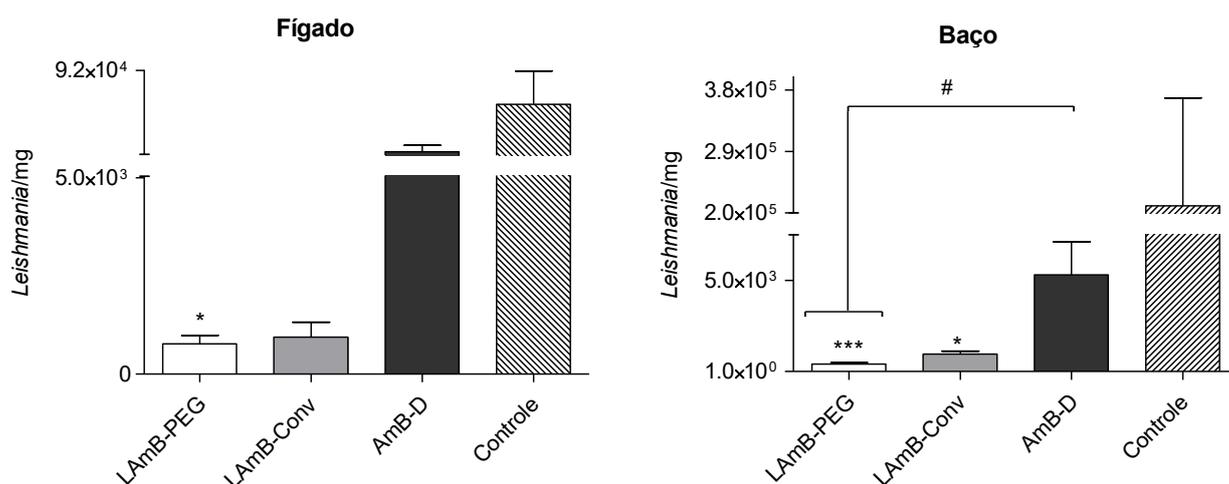


A figura 11 mostra os resultados dos animais tratados com a dose de 10mg/kg das formulações. A infecção do grupo controle (tratado com PBS) apresentou valores diferentes das observadas nos animais do protocolo terapêutico nº 1 (5mg/kg), apesar disso, foi observado uma alta carga parasitária tanto no fígado ( $5,7 \times 10^4$  parasitos/mg de tecido) quanto no baço ( $2,1 \times 10^5$  parasitos/mg de tecido). No fígado a formulação LAmB-PEG foi a que apresentou melhores resultados de supressão da carga parasitária, com diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ) sendo que o número médio de parasitos por mg de tecido ( $7,7 \times 10^2$  *Leishmania*/mg) foi 74,35 vezes menor que o grupo controle, com uma porcentagem de redução de 98,66%. A LAmB-Conv e AmB-D tiveram uma média de parasitos por mg de fígado de  $9,6 \times 10^2$  *Leishmania*/mg e  $8,7 \times 10^3$  *Leishmania*/mg, sendo que a porcentagem de redução (98,37% e 84,65%) foi de 61,17 e 65,14 vezes menor que o determinado pelo grupo controle, sem tratamento.

No baço, a formulação LAmB-PEG apresentou diferença estatística em relação aos grupos controle ( $p < 0,001$ ) e AmB-D ( $p < 0,05$ ), com uma porcentagem de redução 99,81% em relação aos animais do grupo controle tratado com PBS, sendo 516 vezes menor a quantidade

de parasitos por mg de órgão ( $4,0 \times 10^2$ ). Os camundongos tratados com AmB-D apresentaram uma média de parasitos por mg de tecido de  $5,3 \times 10^3$  *Leishmania*/mg. A LAmB-Conv também apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), reduzindo 99,55% a carga parasitária do órgão, sendo 220,53 vezes menor ( $9,5 \times 10^2$ ) em relação ao grupo controle.

**Figura 11** – Carga parasitária de *Leishmania infantum* determinada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) em camundongos tratados com o protocolo terapêutico 2. Fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com  $10^7$  de promastigotas de *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH401), 96h após a administração de formulações lipossomais peguiliadas contendo AmB (LAmB-PEG/10mg/kg/IP/duas doses/96h), formulações lipossomais convencionais contendo AmB (LAmB-Conv/10mg/kg/IP/duas doses/96h). Grupo controle negativo: PBS; Grupo controle positivo: tratado com AmB desoxicolato (AmB-D) (5mg/kg/24h/IP/10 dias). \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$  estatisticamente significante em relação ao grupo controle. Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn's. Fígado: qPCR:  $r = 0,996$ ; slope: -3.489; Baço: qPCR:  $r = 0,976$ ; slope: -3.369.



## 6. DISCUSSÃO

A leishmaniose é considerada, dentre as doenças negligenciadas, a que se encontra em maior expansão, causando impactos e prejuízos na saúde pública. Está intimamente relacionada com a pobreza, sendo estimado que cerca de 90% dos indivíduos infectados viva com somente US\$1 por dia (CHARLTON et al., 2018; WHO, 2019). Em razão disso, a busca por novos compostos a serem utilizados no tratamento dessa importante doença vem sendo cada vez mais necessária.

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento são os derivados de antimoniais pentavalentes, como o AM (Glucantime®), que são utilizados há mais de 70 anos e em algumas regiões da Índia a resistência a essa droga é generalizada (KUMAR et al., 2017;

ROMERO et al., 2017). Os medicamentos de segunda escolha, como a AmB, foram desenvolvidos para o tratamento de outras enfermidades, e assim como os antimonialis, são considerados tóxicos (SUNDAR; AGARWAL, 2018). Atualmente, a AmB tem sido um dos fármacos mais utilizados para o tratamento das leishmanioses. Entretanto, a administração de sua formulação convencional é frequentemente acompanhada por uma toxicidade que se manifesta através de graves efeitos adversos, principalmente nefrotoxicidade e hemólise (BRAGA, 2019; BROTHERTON, et al., 2014). As formulações lipídicas, como por exemplo o Ambisome®, têm sido consideradas alternativas para superar estas desvantagens, já que as interações entre a AmB e os lipídeos previnem a liberação da forma agregada do fármaco, possibilitando uma redução da sua toxicidade para as células de mamíferos (LARABI et al., 2003).

Devido à gama de efeitos colaterais associados à quimioterapia utilizada até o momento, a OMS recomenda e apoia pesquisas e desenvolvimento de fármacos e formulações contra as leishmanioses (WHO, 2019). Neste contexto, estratégias como o uso de lipossomas de circulação prolongada demonstram ser úteis na terapêutica da LV. O uso dessas formulações possibilita menor toxicidade e doses terapêuticas inferiores do que as utilizadas convencionalmente (FRÉZARD, 2012).

Dessa forma, esse trabalho concentrou esforços em propor uma inovadora formulação lipossomal de circulação prolongada contendo AmB, como alternativa à quimioterapia de primeira escolha utilizada atualmente para o tratamento da LV. Investigamos neste estudo, o potencial dessa formulação *in vitro* e *in vivo*.

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

As formulações apresentaram características de sistemas nanoestruturados monodispersos, com o índice de polidispersão baixo ( $<0,3$ ), indicando que houve uma uniformidade do tamanho das vesículas. Uma vez usado uma escala compreendida entre 0 e 1, considera-se um “bom” índice de polidispersão aquele que apresenta um valor inferior a 0,3 representando uma população de partículas com elevada homogeneidade no diâmetro. Pelo contrário, um índice de polidispersão elevado sugere uma ampla distribuição de diâmetro e a existência de várias populações (GAUMET et al., 2008).

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

As extrusões em membrana de policarbonato após a liofilização são consideradas importantes no preparo das formulações, conferindo uniformidade no tamanho hidrodinâmico das vesículas (FRÉZARD et al., 2005; AZEVEDO et al., 2014). O processo de liofilização de lipossomas vazios (Freeze-dried Empty Liposomes – FDEL) apresenta a vantagem tecnológica de não expor o princípio ativo à liofilização, reduzindo riscos de alteração química, além de a formulação resultante poder ser armazenada e a reidratada imediatamente antes da utilização (FRÉZARD, 2000).

Ambas as formulações propostas nesse trabalho apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio reduzidos, característica fundamental para garantir direcionamento eficaz aos órgãos alvo. Os tamanhos dos lipossomas influenciam na distribuição do fármaco no organismo e na eficácia da formulação em modelos murinos de LV. Em um estudo utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani*, Carter e colaboradores (1989) demonstraram que a redução do tamanho das vesículas, de 850 nm para 116 nm, resultou em uma maior supressão da carga parasitária no baço e medula óssea, ou seja, lipossomas convencionais de pequeno tamanho foram mais eficazes do que os lipossomas convencionais de tamanho maior. A redução do diâmetro dos lipossomas de 400 nm para 175 nm e a sua aplicação em cães naturalmente infectados resultou no aumento do tempo de meia-vida de eliminação e na redução da absorção hepática do antimônio (AZEVEDO et. al, 2011).

Ao projetar e desenvolver uma formulação lipossomal, é importante controlar a proporção de fármaco livre (não encapsulado) e encapsulado, isto é, controlar a eficiência de encapsulação (EE) na formulação de lipossomas. O alto encapsulamento de medicamentos é uma característica muito importante e neste trabalho verificou-se que a formulação LAmB-PEG teve taxa média de  $76,4\pm 3,4\%$ , valor semelhante ao obtido por Jung e colaboradores (2009), que prepararam lipossomas peguilados contendo AmB, e visualizaram uma taxa de  $76,5\pm 5\%$ . Lim e colaboradores (2019) também prepararam formulações lipossomais contendo AmB, e verificaram que ao preparar os lipossomas na temperatura de  $65^\circ$ , obtiveram a taxa de  $77.1\pm 4.2\%$  de encapsulação. Neste estudo utilizamos a temperatura de  $60^\circ$  para o preparo das

formulações, e os valores obtidos foram semelhantes aos de eficiência de encapsulação encontrados por esses autores.

Após o preparo e caracterização das formulações foi testada a eficácia dos lipossomas *in vitro*. Um critério importante no desenvolvimento de novos fármacos com ação leishmanicida é a busca por substâncias com menor toxicidade que as drogas utilizadas nos dias atuais (RISS et al., 2016). Devido a isso, foi avaliada a citotoxicidade desses lipossomas, por MTT, um método amplamente adotado para avaliação da viabilidade celular e estudos de proliferação em biologia celular.

No presente estudo, os valores de  $CC_{50}$  obtidos através de testes em macrófagos RAW264.7 foi semelhante para as formulações preparadas, sendo o IS de 16133,071 e 12536,188 para o LAmB-PEG e LAmB-Conv, respectivamente. O IS é a relação entre citotoxicidade do composto para células de mamíferos e sua atividade leishmanicida e é calculado a partir da razão entre a citotoxicidade para macrófagos ( $CC_{50}$ ) e a atividade contra promastigotas ( $CI_{50}$ ). Valores de  $IS > 10,0$  indicam que o composto foi mais tóxico para o parasito em relação à célula hospedeira e valores de  $IS < 10,0$  demonstram toxicidade do composto para macrófagos (DON; IOSET, 2014). Pode-se observar que os valores de IS foram acima de 10, indicando que as formulações não causaram toxicidade para as células avaliadas. Esse resultado está de acordo a literatura, que sugere baixos níveis de toxicidade desse tipo de formulação lipídica para células de mamíferos, confirmando as vantagens da encapsulação do fármaco em vesículas lipossomais, na redução da toxicidade (LEON, 2011; MEHTA, 1984; ROBERTS et al., 2015; PATERE et al., 2017).

Estudos prévios mostram baixa toxicidade às células pelos lipossomas encapsulados com AmB sendo relatada ausência de toxicidade em fibroblastos de camundongos, células embrionárias de rim humano, macrófagos murinos J774A e RAW264.7, dentre outras, em diferentes concentrações (0 à 10000  $\mu\text{g/mL}$ ) e tempo avaliados (5 à 48h) (LEON, 2011; MEHTA, 1984; ROBERTS et al., 2015; PATERE et al., 2017).

Ao avaliar o valor de  $CC_{50}$  na literatura para a AmB-D, foram observados valores inferiores aos encontrados no presente trabalho, como o descrito por Chéron e colaboradores (2003), que testaram AmB-D em macrófagos murinos da linhagem J774 em ensaio MTT e relataram citotoxicidade acima de 10  $\mu\text{M}$  (9,2  $\mu\text{g/mL}$ ). Porém, os autores utilizaram menor tempo de incubação com a formulação (4h) do que o adotado no presente trabalho (24h). Silveira (2016) avaliou a incubação durante 72h em macrófagos murinos e encontrou  $CC_{50}$  para a AmB-D  $>150 \mu\text{M}$  ( $>162 \mu\text{g/mL}$ ). A maior toxicidade encontrada na literatura pode ser justificada devido ao mecanismo de ação da AmB, que possui afinidade maior pelo ergosterol

da membrana do parasito, mas que também pode se ligar ao colesterol presente nas células de mamíferos, causando citotoxicidade (AMBISOME, 2016).

Os valores de  $CC_{50}$  dos lipossomas avaliados foram maiores do que da AmB-D, indicando que o encapsulamento do fármaco, em vesícula lipossomal, não aumentou a citotoxicidade, sendo necessária uma maior concentração do composto para inibir 50% da viabilidade das células de mamíferos. Nosso resultado corrobora com os dados da literatura, nos quais onde autores descobriram que essa metodologia ajuda a proteger as células de mamíferos contra a toxicidade do fármaco, efeito causado pela AmB livre, mantendo sua eficácia (MEHTA, 1984; PATERE *et al*, 2017).

A viabilidade celular das formas promastigotas tratadas com as formulações foi determinada pelo método colorimétrico da resazurina. A resazurina pode ser avaliada por fluorescência, fornecendo precisão na estimativa da multiplicação de promastigotas, sendo usada na triagem de fármacos e estimativa de  $CI_{50}$  (CORRAL *et al.*, 2013). A escolha por realizar os ensaios *in vitro* de 24h de duração foi baseada em resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa (de PAULA, 2019). O LAmB-PEG e LAmB-Conv apresentaram boa atividade leishmanicida, com valores semelhantes de  $IC_{50}$  (20,365ng/mL e 25,215ng/mL respectivamente), enquanto que o valor da AmB-D foi um pouco maior (38,305ng/mL). Ao comparar os lipossomas com o fármaco de referência foi possível observar uma redução na concentração necessária para inibir em 50% o crescimento dos parasitos, indicando uma possível melhora na ação do fármaco ao ser encapsulado em vesícula lipossomal. Esse resultado corrobora com os dados de Patere e colaboradores (2016), no qual os autores modificaram a superfície de lipossomas contendo AmB incorporando um ligante modificado à base de polissacarídeo, com o objetivo de direcionar a AmB ao sistema reticuloendotelial dos macrófagos. Demonstrando uma concentração de  $IC_{50}$  baixa, quando testado em promastigotas de *L. (L.) donovani*, em comparação com a AmB livre e com os lipossomas convencionais, indicando uma melhora na eficácia do fármaco encapsulado.

Na literatura outros estudos também apresentam relatos de uma melhora na eficácia *in vitro* da AmB quando encapsulada em lipossomas, como visto por Iman e colaboradores (2011), que prepararam 32 formulações lipossomais de AmB convencionais com matriz lipídica composta de 1,2-diestigmasterilhemisuccinoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSHemsPC), fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol, e avaliaram o  $IC_{50}$  em *L. (L.) major*, observando valores semelhantes ou melhores do que Fungizone® e AmBisome®. Larabi e colaboradores (2003) também avaliaram a atividade leishmanicida de novas formulações lipídicas convencionais de AmB em comparação às formulações comercialmente disponíveis. Na avaliação *in vitro*

contra cepas de *Leishmania donovani*, a nova formulação proposta foi mais ativa do que Fungizone®, já Amphotec® e AmBisome® foram menos ativos do que Fungizone®.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que todos os lipossomas testados apresentaram boa atividade contra as formas promastigotas e baixa citotoxicidade sendo considerados com atividade seletiva contra *L. (L.) infantum*, *in vitro*.

Após a confirmação da baixa citotoxicidade e da atividade leishmanicida, essas formulações foram testadas contra amastigotas celulares em um ensaio de 48h. Diversos trabalhos têm demonstrado o aumento da eficácia da AmB quando encapsulada em lipossomas, para o tratamento de amastigotas intracelulares, sendo as novas formulações lipídicas propostas mais eficientes que o fármaco na forma livre (ESPUELAS et al., 2000; LARABI et al., 2003; LOISEAU et al., 2002; PATERE et al., 2017). Assim como demonstrado na literatura, os resultados deste estudo sugerem que a formulação LAmB-PEG foi capaz de reduzir de forma significativa as taxas de infecção dos macrófagos em relação ao grupo controle no tempo avaliado. Esse resultado indica que LAmB-PEG pode ser considerado um candidato promissor para o uso terapêutico por parecer afetar eficientemente os parasitos intracelulares sem provocar prejuízos à célula do hospedeiro. Resultado similar ao encontrado por Patere e colaboradores (2017), que produziram lipossomas contendo AmB com superfície modificada à base de polissacarídeo, e estes apresentaram aumento na eficácia do tratamento em amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani* quando comparado com lipossomas convencionais e com a AmB livre.

Os resultados do ensaio de toxicidade em modelo murino indicaram que as formulações foram bem toleradas pelos animais, os quais não apresentaram alterações físicas e comportamentais durante o tratamento, com base em observações de peso, condição da pele, comportamento e expressão facial. Os níveis de TGO e albumina estavam elevados tanto para as formulações quanto para a AmB-D, demonstrando que não houve aumento na toxicidade do fármaco ao ser encapsulado na vesícula lipossomal. Os demais parâmetros analisados (TGP, proteína totais, ureia e creatinina) apresentaram-se normais para as formulações indicando que ao utilizar a metodologia de encapsulamento da AmB em lipossomas tanto convencionais quanto peguilhados, o mesmo contribuiu para a redução da toxicidade *in vivo* do fármaco. Este resultado corrobora com a literatura, no qual os autores relataram que a formulação de AmB encapsulada em lipossomas (AmBisome®) apresentou redução de toxicidade *in vivo* quando comparada ao fármaco livre (Fungisome®), e as doses utilizadas durante o tratamento (5 e 10mg/mL) apresentaram atividade antileishmanicida (WIJNANT, 2018). O encapsulamento da AmB para reduzir a sua toxicidade e melhorar a sua atividade *in*

*vivo* contra a *Leishmania* foi abordado anteriormente (ex. lipossomas e outras preparações) (BERMAN, 1997; LAMOTHE, 2001; SANCHEZ-BRUNETE, 2004) bem como outros patógenos (ex. *Candida* sp.) (MORENO et al., 2001; ESPUELAS, 2003). Em camundongos infectados com *Leishmania donovani*, o AmBisome® foi 5 vezes mais eficaz e 25 vezes menos tóxico que a AmB-D (AMBISOME, 2016).

Para o tratamento de infecções provocadas por patógenos intracelulares como a leishmaniose, é importante entregar as formulações nas células que apresentam maior densidade parasitária, reduzindo a toxicidade e a dose terapêutica, e a incorporação do PEG na vesícula do lipossoma permite direcionamento mais eficaz e prolongado de fármacos leishmanicidas para os órgãos de acesso mais difícil, como medula óssea e pele (FRÉZARD, 2012; AZEVEDO, 2013).

A redução da toxicidade do tratamento com o uso das formulações lipídicas de AmB, comparado ao tratamento convencional é bem estabelecida na literatura utilizando modelos *in vivo*. Essas formulações apresentam vantagens em relação à formulação convencional, devido a maior concentração nos órgãos primários do SMF (baço, fígado e pulmões) e menor concentração nos rins, o que leva a redução da nefrotoxicidade e dos efeitos adversos relacionados à infusão (DISMUKES, 2000; VYAS; GUPTA, 2006).

Em nosso trabalho para avaliar a toxicidade *in vivo*, utilizamos duas doses de 5mg/kg das formulações, administradas com intervalo de 96h entre cada aplicação, com uma dose total de 10mg/kg e para a AmB-D utilizamos 5mg/kg durante 10 dias, com a dose total de 100mg/kg. Mullen e colaboradores (1998) verificaram que a maior dose de AmB tolerada nas formulações lipídicas comerciais (AmBisome®, Abelcet®, Amphocil®, foi de 8 mg/kg, doses acima dessa causaram toxicidade nos animais (MULLEN et al., 1997). Entretanto, Gangneux e colaboradores (1996) verificaram que doses de 50 mg/kg de AmB em formulações lipídicas, até um total de 300 mg/kg, não causaram reações adversas nos animais tratados. Além disso, os autores observaram que nas doses de 5 a 50 mg/kg de AmB foi possível a erradicação completa de parasitas no fígado, baço e pulmões em camundongos infectados com *L. (L.) infantum*. Os autores sugerem que a acumulação da AmB nos tecidos e seu aumento no vacúolo parasitóforo dentro dos macrófagos são os responsáveis pela maior atividade leishmanicida observada com a preparação lipossoma.

Após a avaliação dos resultados da toxicidade em modelo murino foi realizada a avaliação da carga de *Leishmania* no fígado e baço de camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) infantum*, usando a técnica qPCR, que permite amplificar várias cópias de um segmento específico de DNA com rapidez e precisão em um tempo muito menor, sendo amplamente

utilizada em pesquisas e diagnóstico (LIN et al., 2000; CUMMINGS et al., 2003; KAMAU et al., 2011). Desta forma, é possível identificar o ciclo mais próximo do início da fase de amplificação logarítmica da sequência alvo, chamado *threshold* (Ct), e obter o número de cópias da sequência alvo e a carga parasitária da amostra em estudo, sendo apropriada para monitoramento e diagnóstico da carga parasitária em modelos murinos de leishmaniose (MORTARINO et al., 2004; MAIA e CAMPINO, 2008).

Considerando a relevância em avaliar a eficácia do tratamento com a formulação LAmB-PEG, evidenciamos uma redução da carga parasitária no baço e no fígado após a administração dos dois protocolos terapêuticos, sendo que essa formulação mostrou melhores resultados nos dois órgãos, com diferença estatística quando comparado com o grupo controle, nas duas doses utilizadas. Pode-se observar que a AmB-D quando encapsulada em lipossomas peguizados apresentou uma melhora em sua eficácia. Essa melhora pode estar associada ao direcionamento do fármaco para esses órgãos devido ao seu modo de encapsulação, quando a ação leishmanicida se torna mais efetiva no combate ao parasito nesses órgãos que são os principais locais de infecção (FRÉZARD et al., 2005; AZEVEDO et al., 2014). Esse sistema carreador de fármaco permite direcionamento mais eficaz e prolongado de fármacos leishmanicidas para os órgãos de acesso mais difícil, como medula óssea e pele, enquanto lipossomas convencionais proporcionam maior direcionamento e acúmulo dos fármacos no fígado e baço, órgãos com maior densidade parasitária, em indivíduos com LV (AZEVEDO, 2013, REIS et al., 2017).

Quando os animais foram tratados com 10mg/kg, pode-se observar que no baço a LAmB-PEG apresentou diferença estatística quando comparado com a AmB-D. Nossos resultados corroboram com Gangneux e colaboradores (1996a) que mostraram que formulação lipídica (Ambisome®) foi mais eficaz do que a AmB convencional no tratamento da LV em animais infectados com *L. infantum*. Isto tem sido atribuído à maior captação da AmB pelo fígado e baço a partir dos nanocarreadores (GANGNEUX et al., 1996b; PAUL et al., 1997), o que está de acordo com achados já conhecidos, os quais mostram que esses sistemas tendem a se acumular no fígado e baço após administração (VYAS; GUPTA, 2006).

Em nosso estudo observamos que os camundongos tratados com duas doses de 5mg/kg e duas de 10 mg/kg de LAmB-PEG tiveram melhores resultados na supressão da carga parasitária, quando comparado com o fármaco em sua forma livre, com toxicidade reduzida, corroborando com a literatura, no qual camundongos infectados com *Leishmania infantum* e tratados com 3 a 7 doses de 3 mg/kg de AmBisome®, observou-se que todos os

regimes posológicos do AmBisome® curaram os camundongos mais rapidamente do que o estibogluconato de sódio e não produziram toxicidade (AMBISOME, 2016).

Em um outro trabalho utilizando modelo murino de LV, Mullen e colaboradores (1997) desenvolveram um estudo de comparação da atividade leishmanicida de quatro formulações comerciais de AmB (Fungizone®, AmBisome®, Abelcet® e Amphocil®) em modelo murino de LV. Os autores observaram que todas as formulações reduziram significativamente o crescimento dos parasitos no baço e fígado quando comparados ao grupo controle. Além disso, foi observada a supressão do crescimento dos parasitas na medula óssea com todas as formulações, exceto Abelcet®.

Em nosso estudo comparamos dois protocolos terapêuticos, um com a dose administrada de 5mg/kg e o outro com a dose de 10 mg/kg. Não observamos diferenças entre essas duas doses e obtivemos redução acima de 90% para todas as formulações utilizadas, nos dois órgãos avaliados. Este resultado cvai de encontro com a literatura, no qual os autores relataram que a formulação de anfotericina encapsulada em lipossomos (AmBisome) apresentou atividade leishmanicida quando comparada ao fármaco livre (Fungisome), utilizando para o tratamento nas doses de 5 e 10mg/mL (WIJNANT, 2018).

A dose final utilizada no protocolo terapêutico 1 foi de 10mg/kg e do protocolo terapêutico 2 foi de 20 mg/kg, enquanto que a AmB-D foi de 100mg/kg. Observamos uma melhora na eficácia da AmB-D encapsulada, utilizando uma menor dose. Essa redução na dose pode auxiliar na redução dos efeitos colaterais e na redução do custo do tratamento. Devido à sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição, carga da superfície, fluidez da membrana e habilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e/ ou lipofílicos, lipossomas se tornaram potentes carreadores para vários tipos de terapias, possibilitando menor toxicidade e doses terapêuticas inferiores as utilizadas convencionalmente, o que pode levar a menor risco de seleção de parasitos resistentes aos fármacos, um dos principais problemas relacionados ao tratamento da LV (FRÉZARD, 2012).

Os ensaios de comparação dos protocolos terapêuticos *in vivo* foram realizados em momentos diferentes, e apesar de realizados sob as mesmas condições, foi observado uma diferença na carga parasitária dos animais infectados, isso pode estar associado ao lote da cepa utilizada, que foi diferente nos dois momentos.

Nesse trabalho verificamos que a encapsulação da AmB-D em lipossomas apresentou melhores resultados na redução da carga parasitária. Na literatura existem estudos que demonstram que a encapsulação de diferentes fármacos nesse tipo de formulação é mais eficaz para o tratamento de diversas doenças. Frézard e colaboradores (2005) observaram o

aumento de 200 a 700 vezes na eficácia de antimoniais pentavalentes encapsulados em lipossomas de circulação prolongada para o tratamento da leishmaniose visceral em hamsters ou camundongos infectados por *L. (L.) donovani*. Melo et al. (2003) comprovaram a habilidade dos lipossomas em aumentar a eficácia do tartarato de antimônio e potássio (tártaro emético) em infecção com *Schistosoma mansoni*. Lipossomas convencionais e de longa circulação foram empregados no tratamento dos animais infectados, sendo que o grupo tratado com lipossomas furtivos (27 mg/kg) apresentou redução significativa no número de vermes (82%) comparado com o grupo controle. A formulação lipossômica promoveu redução na toxicidade do tartarato de antimônio e potássio. Mourão et al. (2005) avaliaram a eficiência do praziquantel (PZQ), fármaco de primeira escolha no tratamento da esquistossomose, encapsulado em lipossomas no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *S. mansoni*. Os resultados mostraram que os lipossomas contendo PZQ foram mais eficazes na redução de vermes quando comparado com o fármaco livre.

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

Esperamos que os nossos resultados proporcionem um avanço no estudo e no tratamento da LV, aumentando a eficácia, tolerância, reduzindo o custo do tratamento e limitando a resistência aos fármacos.

## 7. CONCLUSÕES

- As formulações LAmB-Conv e LAmB-PEG apresentaram estabilidade elétrica, monodispersão e diâmetro hidrodinâmico médio inferior a 200nm;
- As formulações de circulação prolongada contendo AmB (LAmB-PEG) e as formulações convencionais de AmB (LAmB-Conv) apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania infantum*;

- LAmB-PEG e LAmB-Conv apresentaram uma baixa citotoxicidade para células RAW264.7 apresentando um IT acima de 10 para a espécie de *Leishmania* utilizada;
- LAmB-PEG e LAmB-Conv apresentaram redução na taxa de infecção dos macrófagos por *L. infantum* em relação aos grupos controle;
- Os parâmetros de função renal não foram alterados com o tratamento;
- Os níveis séricos das enzimas TGO e albumina, indicadoras de função hepática, apresentaram-se acima dos valores de referência, para os lipossomas avaliados e para a AmB-D, após o tratamento. Os demais parâmetros da função hepática estavam normais para os lipossomas;
- LAmB-PEG apresentou redução significativa na carga parasitária do fígado e baço de camundongos infectados com *L. infantum* após o tratamento com duas doses de 5mg/kg e 10 mg/kg, com intervalo de 96h entre cada uma, em relação ao grupo controle;
- LAmB-PEG apresentou redução significativa na carga parasitária do baço de camundongos infectados com *L. infantum* após o tratamento com duas doses de 10 mg/kg, com intervalo de 96h entre cada uma, em relação ao grupo AmB-D.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T. M.; HANSEN, C. B.; LOPES DE MENESES, D. E. Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p. 267-284, 1995. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3164-y>.

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>.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.

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. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2004000100043>.

ALVING, C. Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. **Parasitology Today**, v., p. 101-107, 1986. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(86\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0169-4758(86)90039-6).

AMBISOME: anfotericina B lipossomal. Farm. Resp.: Dr. Gilson Hirata Kobori. São Paulo: UNITED MEDICAL LTDA, 2016. bula de remédio.

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

AZEVEDO, E. G.; RIBEIRO, R. R.; FERREIRA, C.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. A.; MICHALICK, M. S. M.; DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Prolonged Blood Circulation Time of Antimony in Dogs with Visceral Leishmaniasis from Liposomes with 175-nm Diameter. **J. Nanomedic. Biotherapeu. Discover.**, v. 1 p. 1-5, 2011.

AZEVEDO, E. G. **Lipossomas de circulação prolongada contendo antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral. 2013. Tese (Doutorado) em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.**

AZEVEDO, E. G.; RIBEIRO, R. R.; SILVA, S. M.; FERREIRA, C. S.; SOUZA, L. E.; FERREIRA, A. A. F.; CASTRO, R. A. O. ; DEMICHELI, C. P.; REZENDE, S. A.; FRÉZARD, F. Use of a mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 10, p. 1551-1560, 2014. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.932347>.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal Medical Research**, v.119, n.6, p.238-58, 2004.

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

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

BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352001000100001>.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, p. 499-503, 2003. <http://dx.doi.org/10.1078/094471103322331458>.

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.; SINDERMANN, H.; GANGULY, N. K. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Journal Infectious Diseases**, v. 196, n.4, p. 591-8., 2007. <https://doi.org/10.1086/519690>.

BRAGA, S. S. Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug Repurposing. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, n. 111660, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111660>.

BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. junho, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose tegumentar americana**. Editora do Ministério da Saúde. 2ed. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL.. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. s. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J. F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 828-831, 2001. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.828-831.2001>.

BRITISH Pharmacopoeia 2005. London: Her Majesty's Stationary Office, 2005.

BROTHERTON, M. C.; BOURASSA, S.; LÉGARÉ, D.; POIRIER, G. G.; DROIT, A.; OUELLETTE, M. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 126-132, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.05.002>.

BRUSCHISCHE, F.; GRADONI, L. The leishmaniasis: old neglected tropical diseases. **Springer**, 1st ed, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>.

BUSH, J. T.; WASUNNA, M.; ALVES, F.; ALVAR, J.; OLLIARO, P. L.; OTIENO, M.; SIBLEY, C. H.; WOURGAFT, N. S.; GUERIN, P. J. Systematic review of clinical trials assessing the therapeutic efficacy of visceral leishmaniasis treatments: A first step to assess the feasibility of establishing an individual patient data sharing platform. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, e0005781, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005781>.

CALDEIRA, Leila Rodrigues. **Nanoemulsões carregadas com anfotericina B para o tratamento das leishmanioses: uma nova abordagem**. 2011. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CATÁLAN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinâmica y Farmacocinética. **Rev Iberoam Micol**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CDC. Global Health e Division of Parasitic Diseases: Parasites e Leishmaniasis. Resources for Health Professionals, **Centers for Disease Control and Prevention**. 2018. Disponível

em: <[https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html)>. Acessado em: 13 agosto de 2018.

CARTER, K. C.; DOLAN, T. F.; ALEXANDER, J.; BAILLIE, A. J.; MCCOLGAN, C. Visceral leishmaniasis: drug carrier system characteristics and the ability to clear parasites from the liver, spleen and bone marrow in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. **Journal Pharmacy Pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 87-91, 1989. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1989.tb06399.x>

CHAGAS, E. Visceral leishmaniasis in Brazil. **Science**, v. 30, n. 2183, p. 397-8, 1936. <https://doi.org/10.1126/science.84.2183.397-a>.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N. et al. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.33, p.89-229, 1938. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761938000100010>.

CHANG, Y.; WONG, Y-H.; HU C-Q. Simultaneous determination of purity and potency of amphotericin B by HPLC. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 735-739, 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2011.83>.

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

CHARLTON, R. L.; ROSSI-BERGMANN, B.; DENNY, P. W., STEEL, P. G. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. **Parasitology**, v. 145, p.219–236, 2018. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000993>.

CHÉRON, M.; PETIT, C.; BOLARD, F. Heat-induced formulation of amphotericin B deoxycholate favours drug uptake by the macrophage-like cell line J774. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 904-910, 2003. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg455>.

CHOUDHURY, K.; ZANDER, D.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; CLOS, J. Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. **International Journal of Parasitology**, v.38, p. 1411-23, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.005>.

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 of Microbiological Methods**, v. 94, n.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. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2959-2963, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200027>.

COSTA, C. H. 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. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000014>.

CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, p. 53–59, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00093-8).

DAMASCENO, B. P. G. L. **Sistema microemulsionado como carreador lipídico para fármacos insolúveis**. 130 f. (Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2010.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, Sao Paulo, v. 4, p. 198-212, 1962. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2010000400001>.

DE PAULA, R. C.; SILVA, S. M.; FARIA, K. F.; FRÉZARD, F.; MOREIRA, C. P. S.; FOUBERT, K.; LOPES, J. C. D.; CAMPANA, P. R. V.; ROCHA, M. P.; SILVA, A. F.; SILVA, C. G.; PIETERS, L.; ALMEIDA, V. L. In vitro antileishmanial activity of leaf and stem extracts of seven Brazilian plant species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 232, p. 155-164, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.026>.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>.

DISMUKES, W.E. Introduction to antifungal drugs. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 653-657, 2000. <https://doi.org/10.1086/313748>.

DPDx/Centers for Disease Control and Prevention. **Leishmaniasis: Image Gallery**. [2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 11 de fev. 2019.

DON, R. O. B.; IOSET, J. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140-146, 2014. <https://doi.org/10.1017/S003118201300142X>.

DUBE, A.; SINGH, N.; SUNDAR, S. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kalaazar field isolates persist in vitro and in vivo experimental models. **Parasitol Research**, v. 96, p. 216–23, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1339-1>.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n.2, p.119-22, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.01.001>.

EGITO, E. S. T.; ARAÚJO, I. B.; DAMASCENO, B. P. G. L.; PRICE, J. C. Amphotericin B/emulsion admixture interactions: an approach concerning the reduction of amphotericin B toxicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 2354-2366, 2002. <https://doi.org/10.1002/jps.10223>.

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 Parasitology**, v. 24, n.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).

ESPUELAS, S.; LEGRAND, P.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BARRATT, G.; IRACHE, J. M. In vitro reversion of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* by poloxamer 188. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2190-2192, 2000. <https://doi.org/10.1128/aac.44.8.2190-2192.2000>.

ESPUELAS, M. S.; LEGRAND, P.; CAMPANERO, M. A.; APPEL, M.; CHERON, M.; GAMAZO, C.; BARRATT, G.; IRACHE, J. M. Polymeric carriers for amphotericin B: in vitro activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 419-427, 2003. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg351>.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Química Nova**, v. 28, p. 511-18, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000300025>.

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, 09 de março de 2012.

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

GANGNEUX, J. P.; SULAHIAN, A.; GARIN, Y. J.; DEROUIN, F. Lipid formulations of amphotericin B in the treatment of experimental visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 574-577, 1996b. [http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203\(96\)90330-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203(96)90330-2).

GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D. C. 2011.

GRAY, K. C.; PALACIOS, D. S.; DAILEY, I.; ENDO, M. M.; UNO, B. E.; WILCOCK, B. C.; BURKE, M. D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 2234-2239, 2012. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117280109>.

GOLENSER, J.; DOMB, A. New formulations and derivatives of amphotericin B for treatment of leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medical Chemistry**, v. 6, p. 153-162, 2006. <http://dx.doi.org/10.2174/138955706775476037>.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p. 71-80, 2003. <http://dx.doi.org/10.2174/138955706775476037>.

GOTO, H; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, p. 419-433, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>.

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

GRIENSVEN, J. V; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 309-322, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>.

GRIMALDI, G. J. R.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-50, 1993. <https://doi.org/10.1128/CMR.6.3.230>.

HARHAY, M. O.; OLLIARIO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n.9, p. 403-409, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911-26, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.09.014>.

IMAN, M.; HUANG, Z.; SZOKA JR, F.C.; JAAFARI, M.R. Characterization of the colloidal properties, in vitro antifungal activity, antileishmanial activity and toxicity in mice of a distigmasterylhemisuccinoyl-glicerol-phosphocholine liposome-intercalated amphotericin B. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 163-172, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.044>.

JAFFE, C. L.; GREENBLATT, C. L. Vaccine development against the intracellular parasite Leishmania. In: *Vaccine and Immunotherapy*, p. 381-403. Pergamon, New York, 1991.

JUNG, S. H.; LIM, D. H.; JUNG, S. H.; LEE, J. E.; JEONG, K. S.; SEONG, H.; SHIN, B. C. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3-4, p. 313-20, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejps>.

KAMAU, E.; TOLBERT, L.S.; KORTEPETER, L.; PRATT, M.; NYAKOE, N.; MURINGO, L.; OGUTU, B.; WAITUMBI, J.N.; OCKENHOUSE, C.F. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of *Plasmodium* by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2946-2953, 2011. <https://doi.org/10.1128/JCM.00276-11>.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>.

KHODABANDEH, M.; ROSTAMI, A.; BORHANI, K.; GAMBLE, H. R.; Mohammadi, M. Treatment of resistant visceral leishmaniasis with interferon gamma in combination with liposomal amphotericin B and allopurinol. *Parasitology international*, p.101934, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101934>.

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes. *Nature Biotechnol*, v. 2, p. 979–984, 1984. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0841>.

KUMAR, R.; CHAUAN, S. B.; NG, S. S.; SUNDAR, S. Immune checkpoint targets for host-directed therapy to prevent and treat leishmaniasis. *Frontiers in Immunol*, v. 8, p. 1492, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01492>.

LACHAUD, L.; BOURGEOIS, N.; PLOURDE, M.; LEPROHON, P.; BASTIEN, P.; OUELLETTE, M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p. e16-e22, 2009. <https://doi.org/10.1086/595710>.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The leishmaniasis in biology and medicine, **In**: p. 291-364. Lainson R, Shaw JJ, Peters W, Killick-Kendrick R 1987, Evolution, classification and geographical distribution. Academic Press. 1987.

LAMOTHE, J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, v. 42, n. 4, 170-175, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2001.tb01797>.

LARABI, M.; YARDLEY, V.; LOISEAU, P. M.; APPEL, M.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BORIES, C.; CROFT, S. L.; BARRATT, G. Toxicity and Antileishmanial Activity of a New Stable Lipid Suspension of Amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 47, p. 3774-3779, 2003. <https://doi.org/10.1128/aac.47.12.3774-3779.2003>.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 68, n.2, p. 151-162, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>.

LEON, C. G.; LEE, J.; BARTLETT, K.; GERSHKOVICH, P.; WASAN, E. K.; ZHAO, J.; CLEMENT, J. G.; WASAN, K. M. In vitro cytotoxicity of two novel oral formulations of Amphotericin B (iCo-009 and iCo-010) against *Candida albicans*, human monocytic and kidney cell lines. *Lipids in Health and Diseases*, v. 20, n. 10, p. 144, 2011. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-144>.

LIN, M.H.; CHEN, T.C.; KUO, T.T.; TSENG, C.C.; TSENG, C.P. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 4121–4125, 2000.

LIM, C. B.; ABUZAR, S. M.; KARN, P. R.; CHO, W.; PARK, H. J.; CHO, C. W.; HWANG, S. J. Preparation, Characterization, and In Vivo Pharmacokinetic Study of the Supercritical

Fluid-Processed Liposomal Amphotericin B. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, 2019. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110589>.

LOISEAU, P. M.; IMBERTIE, L.; BORIES, C.; BETBEDER, D.; DE MIGUEL, I. Design and antileishmanial activity of amphotericin B-loaded stable ionic amphiphile biovector formulations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1597-1601, 2002. <https://doi.org/10.1128/aac.46.5.1597-1601.2002>.

MAES, L.; GERMONPREZ, N.; QUIRIJNEN, L.; VAN PUYVELDE, L.; COS, P.; BERGHE, D. V. Comparative activities of the triterpene saponin maesabalide III and liposomal amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania donovani* in hamsters. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2056-2060, 2004. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2056-2060.2004>.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-87, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028>.

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 de Saúde Pública**, v. 24, p. 2941-2947, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200024>.

MANNA, L. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 271-280, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.028>.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013. <https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v50i5p341-352>.

MARQUES, L. H. S.; ROCHA, I. C. M.; REIS, I. A.; CUNHA, G. M. R.; OLIVEIRA, E.; PFEILSTICKER, T. R.; ARAÚJO, V. E. M.; MORAIS, M. H. F.; RABELLO, A.; CARNEIRO, M. *Leishmania infantum*: illness, transmission profile and risk factors for asymptomatic infection in an endemic metropolis in Brazil. **Parasitology**, v. 144, n. 4, p. 546-556, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002134>.

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>.

MEHTA, R.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; HOPFER, R.; MILLS, K.; JULIANO, R. L. Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 770:230, 1984. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(84\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(84)90135-4).

MELO A. L.; SILVA-BARCELLOS N. M.; DEMICHELI C.; FRÉZARD, F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, p.227–230, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(03\)00125-x](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(03)00125-x).

MELO, E. C. **Avaliação da eficácia e segurança da farmacoterapia da leishmaniose visceral**. [2013]. Tese (Pós-Graduação em Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

MEYERHOFF, A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 42-8, 1999. <https://doi.org/10.1086/515085>.

MORENO, M. A.; PALOMA, F.; PALOMA, B. Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 3, p. 344-351, 2001 <https://doi.org/10.1023/A:1011011215418>.

MORTARINO, M.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCCHI, C.; GENCHI, C.; BANDI, C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parasitologia**. v. 46, n. 1-2, p. 163-7, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n. 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).

MOURÃO, S. C.; COSTA, P. I.; SALGADO, H. R. N.; GREMIÃO, M. P. D. Improved of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**., v. 295, p. 157-162, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.02.009>.

MULLEN, A.B.; CARTER, K.C.; BAILLIE, A.J. Comparison of the efficacies of various formulations of amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, p. 2089-2092, 1997.

NEEDHAM, D.; MCINTOSH, T. J.; LASIC, D. D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1108, p. 40–48, 1992. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90112-y](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90112-y).

OLIVA, A.; SCALONE, A.; MANZILLO, V. F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania* infections detected by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1318-1322, 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1318-1322.2006>.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Informe epidemiológico das Américas. Informe das leishmanioses**, n. 6, fev., 2018. Disponível em: [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6\\_por.pdf?sequence=5](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5). Acessado em: 26 de junho de 2019.

PAHO. Pan American Health Organization. **Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis**. 2014. Disponível em [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=en). Acessado em: 05 de junho de 2019.

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

PARIS, C. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 3, p. 852-9, 2004. <https://doi.org/10.1128/aac.48.3.852-859.2004>.

PATERE, S. N.; PATHAK, P. O.; SHUKLA, A. K.; SINGH, R. K.; DUBEY, V. K.; MEHTA, M. J.; PATIL, A. G.; GOTA, V.; NAGARSENKER, M. S. Surface-modified liposomal formulation of amphotericin B: in vitro evaluation of potential against visceral leishmaniasis. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 3, p. 710-720, 2017. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0553-8>.

PAUL, M.; DURAND, R.; FESSI, H.; RIVOLLET, D.; HOUIN, D.; ASTIER, A.; DENIAU, M. Activity of a New Liposomal Formulation of Amphotericin B against Two Strains of *Leishmania infantum* in a Murine Model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 731, 1997.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. *In vivo* Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-4, 2008. <https://doi.org/10.1126/science.1159194>.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: TERMIGNONI, C.; MASUDA, H.; NETO, M.; SILVA, A. C. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012.

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. **Dados epidemiológicos da LVH**. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/informacoes/vigilancia/vigilancia-epidemiologica/doencas-transmissiveis/leishmaniose>. Acesso em: 19 de dezembro de 2019.

REUS, M.; GARCÍA, B.; VÁZQUEZ, V.; MORALES, D.; FUSTER, M.; SOLA, J. Visceral leishmaniasis: diagnosis by ultrasound-guided fine needle aspiration of an axillary node. **British Journal Radiology**, v.78, p. 158-160, 2005. <https://doi.org/10.1259/bjr/33263789>.

REIS, L. E. S.; BRITO, R. C. F.; CARDOSO, J. M. O. et al. Mixed Formulation of Conventional and Pegylated Meglumine Antimoniate-Containing Liposomes Reduces Inflammatory Process and Parasite Burden in *Leishmania infantum*-Infected BALB/c Mice. **Anti-Cancer Agents Chemotherapy**, v. 24, p. e00962-17, 2017. <https://doi.org/10.1128/AAC.00962-17>.

RIBAS-SILVA R. C.; RIBAS A. D.; FERREIRA E. C.; SILVEIRA T. G.; BORELLI S. D. Association between HLA genes and American cutaneous leishmaniasis in endemic regions of Southern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 198, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-198>.

RIBEIRO, T.G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.G.; VALADARES, D.G.; FRANCA, J.R.; LAGE, P.S.; DUARTE, M.C.; ANDRADE, P.H.R.; MARTINS, V.T.; COSTA, L.E.;

ARRUDA, A.L.A.; FARACO, A.A.G; COELHO, E.A.F.; CASTILHO, F.O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v. 143 p. 60–68, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.05.004>.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. **In: Assay Guidance Manual** [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.

ROBERTS, J. M. D.; BINGHAM, J. M. D.; MCLAREN, A. L.; MCLEMORE, R. M. Liposomal Formulation Decreases Toxicity of Amphotericin B In Vitro and In Vivo. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 473, p. 2262–2269, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4232-y>.

RODRIGUES, I. A.; MAZOTTO, A. M.; CARDOSO, V.; ALVES, R. L., AMARAL, A. C. L.; SILVA, R. A.; PINHEIRO, A. S.; VERMELHO, A. B. Natural products: insights into leishmaniasis inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, v. 835910, p. 12, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/835910>.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 584, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>.

ROMERO, G. A. S.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Collaborative LV Brasil Group, Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: a multicenter, randomized, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. e0005706, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005706>.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. **Br Medical Journal**, v. 14, n. 2, p. 1261-2, 1903. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261>.

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

SANCHEZ-BRUNETE, J. A. M. A.; DEA, S.; RAMA, F.; BOLAS, J. M.; ALUNDA, S.; TORRADO-SANTIAGO, J. J. Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of drug targeting**, v. 12, n. 7, p. 453-460, 2004. <https://doi.org/10.1080/10611860400006596>.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, p. 255-257, 1993. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90070-V](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90070-V).

SIFONTES-RODRÍGUEZ, S.; MONZOTE-FIDALGO, L.; CASTAÑEDO-CANCIO, N.; MONTALVO-ÁLVAREZ, A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, Y.; DIOGO, N. M.; INFANTE-BOURZAC, J. F.; PÉREZ-MARTÍN, O.; MENESES-MARCEL, A.; GARCÍA-TREVIJANO, J. A. E.; CABRERA-PÉREZ, M. A. The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against *Leishmania* in vitro and in vivo. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 166–173, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140324>.

SILVA, S. M.; AMORIM, I. F.; RIBEIRO, R. R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELLI, C.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N. DE F.; MICHALICK, M. S.; FREZARD, F. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated MeglumineAntimoniate and

Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n.6, p. 2858-67, 2012. <https://doi.org/10.1128/AAC.00208-12>.

SILVA, S. M.; PAULA, R. C. FARIA, K. F; FREZARD, F. J. G.; BRITO, J. A. Formulação Lipossomal para o Tratamento das Leishmanioses. 2017, Brasil.  
Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170025829, título: "Formulação Lipossomal para o Tratamento das Leishmanioses", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 08/02/2017.

SILVEIRA, M. M. X. **Estudo de um derivado de aminoquinolina: citotoxicidade em macrófagos, potencial efeito em *Leishmania amazonensis* e mitocôndria**. Monografia (Graduação em Farmácia) – Departamento de farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

SIMPSON, L. Kinetoplast DNA in tripanosomid flagellates. **International Review Cytology**, v. 99, p. 119-207, 1986. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61426-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61426-6).

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Leishmaniose visceral**. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-visceral>>, acesso em 10/06/2019.

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

STEVERDING, D. R. L. The history of leishmaniasis. **Parasites Vectors**, v. 10, nº. 82, p. 10, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.

SUNDAR, S.; SAHU, M.; MEHTA, H.; GUPTA, A.; KOHLI, U.; RAI, M.; BEZMAN, J. D.; MURRAY, H. W. Noninvasive Management of Indian Visceral Leishmaniasis: Clinical application of Diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. **Clinical Infection Diseases.**, v. 35, p. 581 – 6, 2002. <https://doi.org/10.1086/342057>.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; RAI, V. K. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. **Clinical Infection Diseases**, v. 45, p. 556-61, 2007. <https://doi.org/10.1086/520665>.

SUNDAR, S.; AGARWAL, D. Visceral leishmaniasis – Optimum treatment options in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, p. 1, dez. 2017. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001885>.

SUNYOTO, T.; POTET, J.; BOELAERT, M. Why miltefosina a life-saving drug for leishmaniasis is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, v. 3, e000709, 2018. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-000709>.

TEMPONE, A. G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A. L.; MORTARA, R. A.; DE ANDRADE, H. F. J. R. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine.

**Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 60-8, 2004.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkh281>.

TORRADO, J. J.; ESPADA, R.; BALLESTEROS, M. P.; TORRADO-SANTIAGO, S. Amphotericin B formulations and drug targeting. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 2405-2425, 2008. <https://doi.org/10.1002/jps.21179>.

VIDES, J. P.; SCHWARDT, T. F.; SOBRINHO, L. S.; MARINHO, M.; LAURENTI, M. D.; BIONDO, A. W. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 31, n. 178, p. 22-8, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.042>.

VYAS, S.P.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, p. 417-432, 2006.  
<https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.4.417>.

WALLER, R. F.; McCONVILLE, M; J. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. **International Journal Parasitology**. v. 32, p. 1435-1445, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00140-6).

WAGNER, V.; MINGUEZ-MENENDEZ, A.; PENA, J.; FERNÁNDEZ-PRADA, C. Innovative Solutions for the Control of Leishmaniasis: Nanoscale Drug Delivery Systems. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, p. 1582-1592, 2019.  
<https://doi.org/10.2174/1381612825666190621154552>.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. In WHO Technical Report Series, Organization, W.H., ed. (Genebra, World Health Organization), p. 201, 2010.

WHO. Weekly epidemiological record. **World Health Organization**, v. 38, n. 92, p. 557–572, 2017.

World Health Organization (WHO), Leishmaniasis Key Facts, WHO, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acessado em: 16 de outubro de 2018).

WHO. **Leishmaniasis fact sheet**. Disponível em: <[http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0007/246166/Fact-sheet-leishmaniasis-Eng.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/246166/Fact-sheet-leishmaniasis-Eng.pdf?ua=1)>. Acesso em: 04 jun. 2019.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis fact sheet. 2019  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

WIJNANT, G.; BOCXLAER, K. V.; YARDLEY, V.; HARRIS, A.; ALAVIJEH, M.; SILVA-PEDROSA, R. S.; ANTUNES, S.; MAURICIO, I.; MURDAN, S.; CROFTA, S. L. Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 223-228, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.04.001>.

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

## ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia  
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Formulação de anfotericina b em lipossomas de circulação convencional e prolongada para o tratamento da leishmaniose visceral e da leishmaniose tegumentar”, protocolo nº 001/19, sob a responsabilidade de **Sydnei Magno da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **07 de Junho de 2019**.

(We certify that the project entitled “Formulação de anfotericina b em lipossomas de circulação convencional e prolongada para o tratamento da leishmaniose visceral e da leishmaniose tegumentar”, protocol 001/19, under the responsibility of Sydnei Magno da Silva - Involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and It was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of June 07th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 01/07/2019 Término: 01/07/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico BALB/c
Número de animais	80
Peso / Idade	25g/ 4 – 8 Semanas
Sexo	Fêmea
Origem / Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU
Local onde serão mantidos os animais:	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU

Uberlândia, 13 de Junho de 2019.

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU  
Coordenador da CEUA  
Portaria Nº 342 DE 10 DE MAIO DE 2019