

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

**WALYSON COELHO COSTA**

**HEMOCOMPATIBILIDADE E EFEITO SOBRE O SISTEMA IMUNE DE  
LIPOSSOMAS VAZIOS COMPOSTOS DE DICETILFOSTATO OU  
DIPALMITOILFOSFATIDILGLICEROL**

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

Abril de 2015

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

**HEMOCOMPATIBILIDADE E EFEITO SOBRE O SISTEMA IMUNE DE  
LIPOSSOMAS VAZIOS COMPOSTOS DE DICETILFOSTATO OU  
DIPALMITOILFOSFATIDILGLICEROL**

Linha de Pesquisa: Terapêutica, Vacina, Diagnóstico e Prognóstico de Doenças

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como parte das exigências do programa para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Aparecida Rezende

Co-orientadora: Profa. Dra. Carmen Aparecida de Paula

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

2015

C837h Costa, Walyson Coelho.  
Hemocompatibilidade e efeito sobre o sistema imune de lipossomas vazios compostos de dicetilfostato ou dipalmitoilfosfatidilglicerol [manuscrito] / Walyson Coelho Costa. - 2015.  
99f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Aparecida Rezende.  
Coorientadora: Profa. Dra. Carmen Aparecida de Paula.

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

1. Sistema imune. 2. Toxicidade - Testes. 3. Sangue - Coagulação. 4. Macrófagos. I. Rezende, Simone Aparecida. II. Paula, Carmen Aparecida de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.27:615.9

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)

1

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 97ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA ESCOLA DE  
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

2 Aos dez dias do mês de abril de dois mil e quinze, sexta-feira, realizou-se, a partir das  
3 doze horas e trinta minutos, na sala 201 do Bloco de Salas de Aulas, Campus UFOP, a  
4 sessão de defesa de dissertação do candidato ao grau de Mestre em Ciências  
5 Farmacêuticas, Walyson Coelho Costa, intitulada: "Hemocompatibilidade e efeito  
6 sobre o sistema imune de lipossomas vazios compostos de dicetilfosfato ou  
7 dipalmitoilfosfatidilglicerol". A banca examinadora foi constituída pela Dra. Andréa  
8 Teixeira Carvalho (Centro de Pesquisas René Rachou), Profa. Dra. Vanessa Carla  
9 Furtado Mosqueira (UFOP), e pela orientadora Profa. Dra. Simone Aparecida Rezende.  
10 De acordo com o regulamento do curso, a orientadora Profa. Dra. Simone Aparecida  
11 Rezende, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez  
12 a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores  
13 na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a  
14 Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato, tendo deliberado pela sua  
15 aprovação. Nada mais havendo para constar, lavrou-se a presente ata por mim, Maria  
16 das Mercês Fortes da Silva Miranda, secretária do CiPharma, e fez-se a leitura da  
17 presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela  
18 Coordenadora do Curso.

19

20

Ouro Preto, 10 de abril de 2015.

21

22



Dra. Andréa Teixeira Carvalho  
(René Rachou)

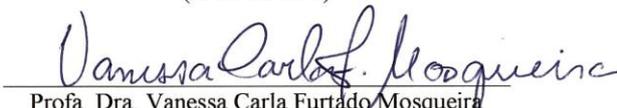
24

25

26

27

28



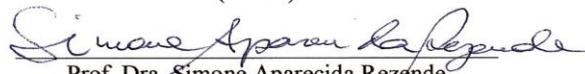
Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira  
(UFOP)

29

30

31

32



Prof. Dra. Simone Aparecida Rezende  
(UFOP)

33

34

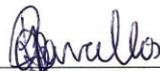
35

36

37

38

39



Prof. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos

Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

*“Ó mar salgado, quanto do teu sal  
São lágrimas de Portugal!  
Por te cruzarmos, quantas mães choraram,  
Quantos filhos em vão rezaram!  
Quantas noivas ficaram por casar  
Para que fosses nosso, ó mar!*

*Valeu a pena?  
Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,  
Mas nele é que espelhou o céu.”*

*Fernando Pessoa*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre! Agradeço pela oportunidade e por ter me concedido forças para trilhar um novo caminho, o qual era desconhecido e que começou a fazer parte de mim a cada dia. Pelo amparo nos meus momentos de angústias e pelo calor sentido no coração nos momentos de alegria. Também agradeço a proteção de Nossa Senhora, que a todo o momento, carregou-me em seu colo, acolhendo-me como um filho querido.

Aos meus queridos pais, que são o alicerce fundamental da minha vida, agradeço o constante amor, o carinho e a atenção. Agradeço pelas conversas, conselhos e pelo imenso apoio. A vocês, dedico esse trabalho.

Aos meus irmãos e familiares, obrigado por se fazerem presentes, por torcerem pelos meus estudos e por todo carinho.

A professora Dra. Simone Aparecida Rezende, minha orientadora, que sempre se mostrou disponível e pela grande oportunidade de desenvolver esse projeto. Agradeço por toda sua atenção e cuidado. Serei eternamente grato a você. Desejo uma carreira repleta de sucessos.

A professora Dra. Carmen Aparecida de Paula, pela co-orientação, por todo ensinamento e pelo imenso carinho.

Ao professor Frederic Frézard e a sua equipe, pela colaboração, contribuição científica e o auxílio necessário para o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigado!

Ao prof. Luiz Carlos Crocco, Míriam e Rodrigo Saar, pelo espaço cedido no Laboratório de Imunoparasitologia e a contribuição nos experimentos realizados.

A Daiane, Débora e Tamara, amigas do Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC), do qual me orgulho de ter feito parte e desenvolvido minha pesquisa, muito

obrigado por toda ajuda e contribuição ao longo dessa etapa. Também, quero agradecer a grande amizade da Fernanda Perasoli e do Luan Bianchini e pelos bons momentos compartilhados no CIPHARMA.

De forma especial e com todo o meu carinho, agradeço a Mônica Auxiliadora de Paula, que se tornou muito mais que uma amiga. Obrigado, Moniquinha, por toda a sua ajuda, seu companheirismo, os bons momentos, as risadas e o conhecimento compartilhado. Muita saúde e sucesso para você!

A Janine Braga (Janes) e a Patrícia Capelari, muito obrigado pela amizade e disponibilidade. Janes, lembrarei sempre dos bons momentos em Ouro Preto e da sua amizade. Pati, sou imensamente grato à sua generosidade e pela troca de conhecimento e experiências.

Ao meu grande amigo, Welberty Marques. Obrigado por toda força, orações e pela amizade.

Enfim, gostaria de agradecer a Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade do desenvolvimento do estudo.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diferentes tipos de lipossomas de acordo com sua característica superficial .....	19
<b>Figura 2:</b> Transporte de fármacos nas vesículas lipossomais .....	20
<b>Figura 3:</b> Adesão, ativação e agregação plaquetária .....	28
<b>Figura 4:</b> Representação da cascata da coagulação .....	29
<b>Figura 5:</b> Sistema do complemento .....	33
<b>Figura 6:</b> Ativação de macrófagos .....	36
<b>Figura 7:</b> Estrutura molecular dos fosfolipídios dicetilfosfato (DCP) e dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG).....	38
<b>Figura 8:</b> Avaliação da atividade hemolítica da formulação lipossomal constituída por DCP (A) e DPPG (B).....	56
<b>Figura 9:</b> Tempo de Protrombina (TP): lipossomas DCP (A) e lipossomas DPPG (B).....	59
<b>Figura 10:</b> Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa): lipossomas DCP (A) e lipossomas DPPG (B) .....	60
<b>Figura 11:</b> Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DCP (A) e DPPG (B) sobre a contagem de plaquetas .....	63
<b>Figura 12:</b> Efeito das formulações lipossomais DCP ou DPPG sobre o sistema do complemento: quantificação dos níveis séricos de C3a .....	64
<b>Figura 13:</b> Efeito das formulações lipossomais DCP ou DPPG sobre o sistema do complemento: quantificação dos níveis séricos do complexo SC5b-9 .....	65
<b>Figura 14:</b> Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DCP sobre a viabilidade de macrófagos J774.A1 .....	69
<b>Figura 15:</b> Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DCP na presença de soro humano fresco .....	69
<b>Figura 16:</b> Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DPPG sobre a viabilidade de macrófagos J774.A1.....	70
<b>Figura 17:</b> Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DPPG na presença de soro humano fresco .....	70

<b>Figura 18:</b> Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DCP sobre a viabilidade de macrófagos J774.A1 - (500 a 10.000 µg/mL) .....	72
<b>Figura 19:</b> Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DCP na presença de soro humano fresco - (500 a 10.000 µg/mL) .....	72
<b>Figura 20:</b> Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DPPG sobre a viabilidade de macrófagos J774.A1- (500 a 10.000 µg/mL) .....	73
<b>Figura 21:</b> Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DPPG na presença de soro humano fresco- (500 a 10.000 µg/mL) .....	73
<b>Figura 22:</b> Efeito de lipossomas constituídos por DCP sobre a produção de óxido nítrico após a incubação com macrófagos J774.A1 .....	74
<b>Figura 23:</b> Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DCP na presença de soro humano fresco .....	75
<b>Figura 24:</b> Efeito de lipossomas constituídos por DPPG sobre a produção de óxido nítrico após a incubação com macrófagos J774.A1 .....	75
<b>Figura 25:</b> Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DPPG na presença de soro humano fresco .....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Exemplos de fosfolipídios empregados na composição de lipossomas utilizados para formulações para uso humano .....	17
<b>Tabela 2:</b> Curva de hemólise .....	44
<b>Tabela 3:</b> Teste de atividade hemolítica .....	45
<b>Tabela 4:</b> Caracterização dos lipossomas antes da liofilização .....	54
<b>Tabela 5:</b> Caracterização dos lipossomas após reidratação .....	55
<b>Tabela 6:</b> Concentração de hemoglobina no sobrenadante dos testes com lipossomas DCP .....	57
<b>Tabela 7:</b> Concentração de hemoglobina no sobrenadante dos testes com lipossomas DPPG.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac- anticorpo

ADP - adenosina difosfato

AM - antimoniato de N-metil-glucamina

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

ATP - adenosina trifosfato

ATG – guanosina trifosfato

CAMP - cininogênio de alto peso molecular

CARPA - *complement activation related pseudoallergy* ou pseudoalergia relacionada à ativação do complemento.

CHOL - colesterol

DGP - dicetilfosfato

DOTAP - 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano

DPPG - dipalmitoilfosfatidilglicerol

DSPC - diestearoilfosfatidilcolina

FDA - *Food and Drug Administration*

FDEL - *freeze dried empty liposomes*

FT - fator tecidual

FV - fator V

FVa - fator Va

FXIII - fator XIII

FXIIIa - fator XIIIa

GOV - *giant oligolamellar vesicles*

GP1Ib-IIIa - glicoproteína GP1Ib-IIIa

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IgE - imunoglobulina E

IL-10 - interleucina 10

IP - índice de polidispersão

LAPAC - Laboratório Piloto de Análises Clínicas

LPS - lipopolissacarídeo

LUV - *large unilamellar vesicles* – vesículas unilamelares grandes

MLV - *multilamellar vesicles* – vesículas multilamelares

MTT- brometo de 3-[4,5 dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólico

NO - óxido nítrico

OLV - *oligolamellar vesicles* – vesículas oligolamelares

PBS - solução salina tamponada com tampão fosfato

PEG - polietilenoglicol

PK - pré-caliceína

SbIII - antimônio trivalente

SbV - antimônio pentavalente

SDS - dodecil sulfato de sódio

SFB - soro fetal bovino

SFM - sistema fagocítico mononuclear

SUV - *small unilamellar vesicles* – vesículas unilamelares pequenas

Tc - temperatura de transição de fase

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

TP - tempo de protrombina

TTPa - tempo de tromboplastina parcial ativada

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

VPM - volume plaquetário médio

vWF - fator de von Willebrand

## RESUMO

Lipossomas são sistemas de vetorização constituídos basicamente por fosfolipídios e colesterol e que têm sido amplamente usados como carreadores de fármacos, apresentando, dentre outras vantagens, a redução de efeitos adversos em comparação aos observados pelo uso de fármacos na forma livre. Devido ao fato possibilidade dos lipossomas serem naturalmente direcionados aos macrófagos, os quais são alvos da infecção por *Leishmania*, seu uso apresenta-se promissor para o tratamento das leishmanioses. Como ainda não existe disponível nenhuma formulação lipossomal contendo antimoniato de meglumina (AM), fármaco de primeira escolha na terapia das leishmanioses, a proposição de uma formulação contendo esse fármaco que apresente bons resultados no tratamento da doença e segurança adequada é alvo de inúmeras pesquisas. Formulações promissoras contendo AM têm sido propostas, porém algumas reações adversas têm sido apontadas pelo uso desse sistema, as quais parecem estar relacionadas ao uso do fosfolipídio dicetilfosfato (DCP). Assim, foi proposta uma nova formulação lipossomal em que o DCP foi substituído pelo fosfolipídio dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) com o objetivo de tentar reduzir as reações adversas observadas. Dessa forma, neste trabalho, foram realizados testes *in vitro* para avaliar o efeito das duas formulações vazias sobre componentes celulares e plasmáticos, a saber, a avaliação do efeito sobre as hemácias e sobre a hemostasia. Também foram realizados testes para avaliação do efeito das vesículas lipossomais sobre a linhagem J774 de macrófagos, através da determinação da viabilidade celular e da produção de óxido nítrico, e o efeito sobre o sistema complemento, avaliado pela formação de C3a e de SC5b-9.

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que as duas formulações não tiveram efeito sobre a maioria dos testes realizados. Porém, a formulação lipossomal constituída por DCP provocou ativação do sistema complemento, com aumento da formação de C3a. Além disso, essa formulação provocou uma diminuição da viabilidade de macrófagos. Esses dados sugerem que as reações adversas observadas em estudos anteriores podem ser devido ao DCP presente na vesícula lipossomal.

**Palavras chaves:** Lipossomas. Dicetilfosfato. Dipalmitoilfosfatidilglicerol. Coagulação. Macrófagos. Plaquetas. Toxicidade. Complemento. Hemácias.

## ABSTRACT

Liposomes are a type of vectoring system consisting primarily of phospholipids and cholesterol. These particles have the advantage to reduce the adverse effects observed with drugs encapsulated in comparison to free drugs. Due to the fact that liposomes are naturally targeted to macrophages of the mononuclear phagocytic system (FMS), which are targets of infection by parasites of the genus *Leishmania*, they are adequate for the treatment of leishmaniasis. Since there is not any liposomal formulation containing meglumine antimoniate (AM), drug of choice in the treatment of leishmaniasis, the proposition of a formulation containing this drug that presents good results in the treatment of disease and adequate security is target of numerous research. Promising formulations containing AM have been proposed, however, some adverse reactions have been identified, such as hematological disorders. Some of these changes seem to be related to the use of dicetylphosphate phospholipid (DCP). Thus, a new liposomal formulation was testes in which DCP was replaced by dipalmitoilfosfatidilglicerol phospholipid (DPPG) in order to reduce adverse reactions observed. Thus, *in vitro* tests were performed to evaluate the effect of the two formulations over cellular components and plasmatic components, namely the evaluation of the hemolytic effect and influence on hemostasis. Furthermore, tests were performed to evaluate the effect of liposome vesicles on the J774 macrophage lineage, by determining the cell viability and the production of nitric oxide, as well as the effect on complement system, measured by the formation of C3a and SC5b-complex -9.

The results of this study showed that both formulations had no effect on most of the tests. However, liposomal formulation comprised of DCP was capable of activating the complement system, with increased formation of C3a. In addition, this formulation caused a decrease in the viability of macrophages. These data suggest that the adverse effects observed in previous studies may be due to phospholipid DCP present in the liposomal vesicle.

**Keywords:** Liposomes. Dicetylphosphate. Dipalmitoylphosphatidylglycerol. Coagulation. Macrophages. Platelets. Toxicity. Complement. Red blood cells

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE SIGLAS .....	10
RESUMO .....	12
1 REVISÃO DA LITERATURA .....	16
1.1 Características gerais dos lipossomas.....	16
1.2 Lipossomas e sua interação com os sistemas biológicos .....	20
1.3 Lipossomas e o tratamento das leishmanioses.....	22
2 INTERAÇÃO ENTRE LIPOSSOMAS E COMPONENTES SANGUÍNEOS.....	24
2.1 Hemólise .....	24
2.2 Efeito sobre a coagulação.....	26
2.3 Ativação Plaquetária .....	27
2.4 Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) .....	29
2.5 Tempo de Protrombina (TP) .....	30
2.6 Ativação do Complemento .....	32
3 EFEITOS DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS SOBRE MACRÓFAGOS .....	34
3.1 Captura por macrófagos.....	34
3.2 Resposta dos macrófagos na leishmaniose.....	35
3.3 Lipossomas contendo dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG).....	37
4 OBJETIVOS .....	39
4.1 Objetivo Geral .....	39
4.2 Objetivos Específicos:.....	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
5.1 Amostras.....	40
5.2 Preparo e caracterização das formulações lipossomais (DPC e DPPG) – vazias ..	40
5.3 Determinação das concentrações lipossomais (DCP e DPPG).....	41
5.4 Diluição dos lipossomas liofilizados: preparo das formulações vazias.....	42
5.5 Ensaio de atividade hemolítica.....	43
5.6 Avaliação do efeito das formulações lipossomais sobre a cascata da coagulação	46
5.6.1 Tempo de Protrombina (PT) .....	46
5.6.2 Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa).....	47
5.7 Efeito dos lipossomas sobre a contagem de plaquetas .....	47

5.8	Efeito das formulações lipossomais sobre a ativação do sistema do complemento	48
5.8.1	Quantificação dos níveis de C3a	48
5.8.2	Quantificação dos níveis do complexo SC5b-9	49
5.9	Cultura de macrófagos J774. A1	51
5.10	Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após o tratamento com as formulações lipossomais vazias	51
5.11	Produção de óxido nítrico por macrófagos	52
5.12	Análises estatísticas	53
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1	Obtenção e caracterização dos lipossomas vazios	54
6.2	Ensaio de atividade hemolítica	56
6.3	Avaliação do efeito das formulações lipossomais sobre a cascata da coagulação	59
6.4	Efeito dos lipossomas sobre a contagem de plaquetas	61
6.5	Efeito das formulações lipossomais sobre a ativação do sistema do complemento	64
6.5.1	Quantificação dos níveis séricos de C3a e do complexo SC5b-9	64
6.6	Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após o tratamento com as formulações lipossomais vazias	68
6.7	Produção de óxido nítrico por macrófagos com as formulações lipossomais vazias	74
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
8	CONCLUSÃO	81
9	REFERÊNCIAS	82
10	APÊNDICES	93
11	ANEXO	98

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Características gerais dos lipossomas

Atualmente, várias formulações têm sido propostas para a vetorização de fármacos no organismo. Essas formulações têm por objetivo modular e, se possível, direcionar por meio de um transportador (ou vetor), uma substância a um alvo específico (PUISIEUX & ROBLOT-TREUPEL, 1988; FREZÁRD et al., 2005). Dentre os vetores, destacam-se os lipossomas, um tipo de sistema de vetorização que tem sido amplamente utilizado nos últimos anos (ZHANG et al., 2013). Os lipossomas compreendem partículas formadas por uma vesícula esférica, com tamanho de 50 nm a 5 µm, constituídas de uma ou várias bicamadas lipídicas e que possuem a capacidade de armazenar em seu interior ou adsorvidos à sua membrana bioativos como fármacos, nutrientes ou marcadores usados em exames de diagnóstico por imagem (FRÉZARD et al., 2005, FRÉZARD & DEMICHELI, 2010, ZHANG et al., 2013).

Várias moléculas com características anfífilas naturais como os fosfolipídios e compostos sintéticos podem fazer parte da estrutura dos lipossomas, os quais são compostos também por colesterol. Dentre os fosfolipídios, destacam-se as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiélna que tendem a formar uma bicamada lipídica em solução aquosa (Tabela 1). Os fosfolipídios mais empregados para a formulação dos lipossomas são as fosfatidilcolinas, que possuem grande estabilidade frente as variações de pH ou da concentração de sal (FRÉZARD et al., 2005; BATISTA, CARVALHO & MAGALHÃES, 2007, AKBARZADEH et al., 2013). O colesterol presente na estrutura possui um papel importante na estabilidade das vesículas além de evitar o extravasamento prematuro de fármacos encapsulados (WASSEF, 1995; FRÉZARD & DEMICHELI, 2010).

**Tabela 1: Exemplos de fosfolipídios empregados na composição de lipossomas utilizados em formulações para uso humano.**

Fosfolipídios (R <sub>1</sub> )	Cadeia hidrofóbica de ácido graxo (R <sub>1</sub> ,R <sub>2</sub> )	Nomenclatura e abreviatura	Tc (°C)	Carga
Fosfatidilcolina (PC)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -(O)-	Dioléilfosfatidilcolina (DOPC)	<0	Anfótera
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N+(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -C(O)-	Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)	23	Anfótera
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	42	Anfótera
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -C(O)-	Diesteoilfosfatidilcolina (DSPC)	55	Anfótera
Fosfatidiletanolamina (PE)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -(O)-	Dioléilfosfatidiletanolamina (DOPE)	<0	Anfótera
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -C(O)-	Diesteoilfosfatidiletanolamina (DSPE)	74	Anfótera
Fosfatidilglicerol (PG)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -C(O)-	Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG)	13	Negativa
CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)	35	Negativa
Fosfatidilserina (PS)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS)	79	Negativa
CH <sub>2</sub> CHNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> COO-	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -C(O)-	Diesteoilfosfatidilserina (DSPS)	79	Negativa

**Tc:** de Temperatura de Transição Fase

**Fonte:** BATISTA, CARVALHO & MAGALHÃES, 2007.

Outro fator importante a ser considerado nas vesículas lipossomais é o estado físico em que elas podem ser encontradas, fase cristal-líquido (ou “fluida”) ou fase gel. Isso será dependente da Temperatura de Transição de Fase (Tc), que é uma característica dos lipídios que constituem as vesículas. Quando o lipossoma é formado por lipídios de Tc menor que a temperatura do meio em que se encontram, sua membrana se encontrará na fase cristal-líquido, onde suas cadeias hidrocarbonadas terão grande liberdade de movimento e os radicais hidrofílicos estarão completamente hidratados. Porém, nesses lipossomas observa-se maior extravasamento dos fármacos encapsulados na fase aquosa. Por outro lado, as vesículas formadas por lipídios de Tc maior que a temperatura do ambiente estudado terão menor fluidez na membrana e se encontrarão na fase gel e o extravasamento de fármacos encapsulados será menor. Ainda, a incorporação de colesterol na bicamada lipídica possui importante papel na fluidez da membrana dos lipossomas. É visto que a incorporação de colesterol na membrana de lipossomas constituídos por fosfolipídios de cadeias insaturadas aumenta a rigidez da membrana, enquanto que a incorporação de colesterol na membrana de vesículas lipossomais constituídas por

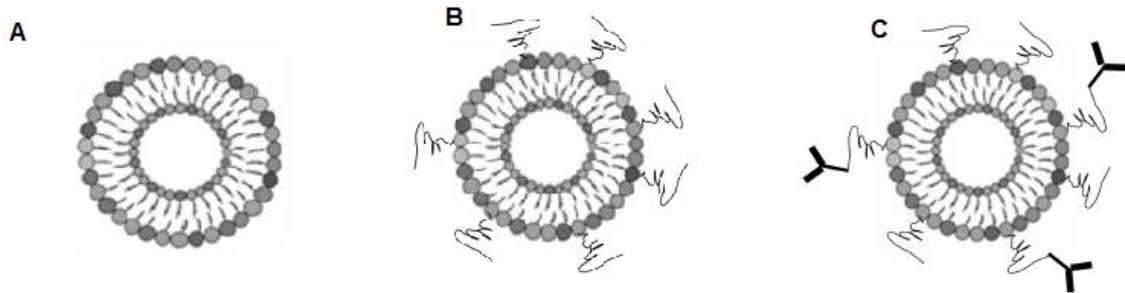
fosfolípidios de cadeias saturadas diminui a rigidez da membrana desses lipossomas (SHARMA & SHARMA, 1997; FRÉZARD et al., 2005; AKBARZADEH et al., 2013).

Os lipossomas podem ser formados por uma bicamada ou por mais bicamadas lipídicas que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo, e podem ter diferentes tamanhos (MERTINS, 2004; FRÉZARD et al., 2005). Lipossomas multilamelares (*multilamellar vesicles* - MLV) são formados por vesículas com um tamanho médio que varia de 400 nm a alguns micrômetros. Os lipossomas unilamelares podem ser classificados em: lipossomas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles* -LUV), com diâmetro variando de 80 nm a 1 µm e lipossomas unilamelares pequenos (*small unilamellar vesicles* - SUV), com variação de diâmetro entre 20 e 80 nm. Também são descritos os lipossomas gigantes unilamelares (*giant unilamellar vesicles* - GUV) ou oligolamelares (*giant oligolamellar vesicles* - GOV) com diâmetro maior que 1 µm (MERTINS, 2004; TIKSHDEEP et al., 2012).

Além disso, os lipossomas podem ser classificados em lipossomas convencionais, que são vesículas formadas basicamente por fosfatidilcolina ou outros fosfolípidios e por colesterol. Também, podem ser classificados em lipossomas furtivos, os quais são constituídos de polímeros de etilenoglicol (PEG), o que reduz a sua captura pelos macrófagos e aumenta a sua permanência na corrente sanguínea.

Quando o lipossoma convencional é administrado por via endovenosa, ele é naturalmente fagocitado por macrófagos, principalmente por macrófagos do fígado, baço e medula óssea. Isso irá resultar no aumento da concentração do fármaco encapsulado nesses órgãos, assim como uma redução em outros, como coração e rins (FREZARD et al., 2005; ALLEN & CULLIS, 2013). Já, quando lipossomas furtivos são administrados pela mesma via, eles tendem a permanecer por maior tempo na corrente sanguínea, aumentando seu tempo de meia vida, e assim, substâncias encapsuladas nesse tipo de lipossoma podem se distribuir melhor em outros órgãos, além daqueles do SFM. Além disso, outra característica importante das formulações lipossomais é que elas podem ser direcionadas a certos tipos celulares pelo uso de anticorpos ou ligantes na extremidade dos polímeros que estão acoplados à membrana lipossomal. Neste caso, os lipossomas são classificados como lipossomas pilotados (Fig.1) (WOODLE & LASIC, 1992, ZHANG et al., 2013).

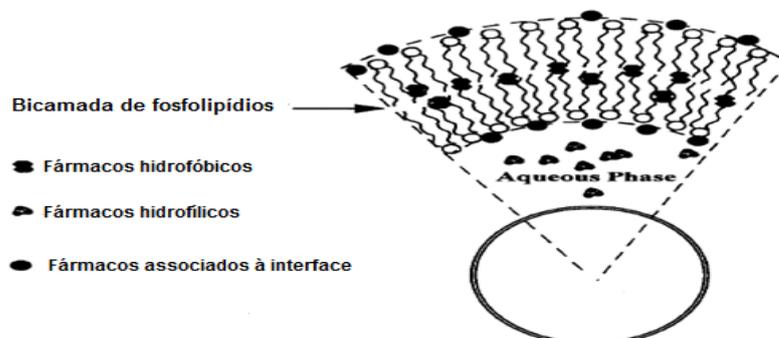
**FIG. 1: Diferentes tipos de lipossomas de acordo com sua característica superficial:** (A) Lipossoma convencional, formado por fosfolipídios e colesterol. (B) Lipossoma furtivo, revestido por PEG na superfície externa. (C) Lipossoma pilotado, formado pelo acoplamento de anticorpos aos fosfolipídios da vesícula lipossomal.



**Fonte:** Adaptado de ZANG et al., 2013.

Em relação ao transporte de fármacos, foi demonstrado que eles podem ser transportados em diferentes locais nas vesículas de lipossomas. Essa característica vai depender das propriedades físico-químicas do fármaco a ser encapsulado e dos fosfolipídios que constituem a vesícula lipossomal. Assim, os fármacos hidrossolúveis podem ser transportados no espaço aquoso interno, por interagirem melhor com as cabeças polares dos fosfolipídios. Já os fármacos lipossolúveis, de caráter apolar, são transportados na bicamada lipídica, interagindo com as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolipídios. Além disso, é visto que os fármacos também podem ser transportados aderidos à face externa da vesícula lipossomal (Fig.2) (OLIVEIRA, 1993; SHARMA & SHARMA, 1997, AKBARZADEH et al., 2013).

**FIG. 2: Transporte de fármacos nas vesículas lipossomais:** Os fármacos podem ser transportados no espaço aquoso interno, quando possuem um caráter polar, ou entre as cadeias hidrocarbonadas da bicamada lipídica, quando possuem caráter apolar. Além disso, os fármacos podem ser transportados adsorvidos na face externa da membrana lipossomal.



Fonte: SHARMA & SHARMA, 1997.

## 1.2 Lipossomas e sua interação com os sistemas biológicos

É relatado na literatura que, após a administração de lipossomas no organismo, ocorre a interação entre essas vesículas e elementos presentes na corrente sanguínea, como hemácias, plaquetas, proteínas plasmáticas e componentes do sistema imune. Essa interação vai depender de características relacionadas às vesículas lipossomais, como tamanho, carga superficial e também de componentes plasmáticos e teciduais (SHARMA & SHARMA, 1997; BERTRAND & LEROUX, 2012, FROHLICH, 2012).

Foi relatado que lipossomas grandes são mais rapidamente fagocitados por macrófagos quando comparados aos lipossomas pequenos. Esse fato está relacionado à maior interação entre os lipossomas e a membrana dos macrófagos, proporcionando maior área de contato entre a vesícula lipossomal e macrófagos. Além disso, é também relatado que nestas partículas há uma maior adsorção de proteínas do sistema do complemento e anticorpos que são de fundamental importância no processo da fagocitose, uma vez que há receptores para as proteínas do complemento e de anticorpos na superfície de macrófagos (SHARMA & SHARMA, 1997; KATSNELSON et al., 2011; BERTRAND & LEROUX, 2012; LANDESMAN-MILO & PEER, 2012; LANKOFF et al., 2012).

Em relação à carga das partículas lipossomais, verificou-se que lipossomas carregados tanto positivamente quanto negativamente podem ser fagocitados com maior eficiência por macrófagos quando comparado a partículas neutras. Assim, observou-se que as vesículas carregadas com carga negativa são fagocitadas e eliminadas do organismo mais rapidamente do que as vesículas neutras. Além disso, foi demonstrado também que lipossomas catiônicos podem provocar a ativação do sistema complemento e a rápida eliminação por macrófagos (FROHLICH, 2012, LANDESMAN-MILO & PEER, 2012). A captura de lipossomas catiônicos também está relacionada ao processo de endocitose ou entrada direta pela interação de lipopoliaminas catiônicas dos lipídios que compõem a estrutura dos lipossomas com as proteoglicanas da membrana celular, favorecendo a internalização das vesículas (SHARMA & SHARMA, 1997; FROHLICH, 2012, LANDESMAN-MILO & PEER, 2012). Em adição a esses achados, foi demonstrado que lipídios catiônicos podem estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T (LANDESMAN-MILO & PEER, 2012).

Outras interações podem ser observadas após a administração de lipossomas no organismo. KUZNETSOVA et al. (2012) mostraram que um tipo de lipossoma constituído por fosfatidilcolina de ovo e por fosfatidilinositol de *Saccharomyces cerevisiae*, no qual foi encapsulado o fármaco metotrexato, levou ao aumento do tempo de coagulação e a ativação do sistema do complemento. Por outro lado, esses lipossomas não provocaram alterações na contagem de células vermelhas, plaquetas e na taxa de hemólise. Outro estudo mostrou que partículas compostas pelo lipídio catiônico multivalente Lipofect AMINE2000 podem apresentar maior toxicidade em comparação a partículas formadas por lipídios catiônicos monovalentes, como o 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP). Além desses achados, foi verificado um aumento do nível sérico de enzimas hepáticas e perda de peso em camundongos tratados com DOTAP em relação a camundongos tratados com vesículas compostas por lipídios neutros ou carregados negativamente, demonstrando uma ação tóxica de lipossomas com potencial zeta positivo (LANDESMAN-MILO & PEER, 2012). Assim, é de extrema importância avaliar esses possíveis efeitos adversos, a fim de evitar que essas alterações possam acontecer após a administração de lipossomas no organismo.

Em um estudo realizado com lipossomas contendo dicetilfosfato (DCP) preparados pela técnica de evaporação por fase reversa, foram observadas

alterações patológicas em macacos após a administração endovenosa de vesículas com ou sem antimônio pentavalente (SbV), com diminuição da contagem de plaquetas e um aumento de quatro vezes do tamanho do baço, além da presença de macrófagos espumantes, os quais possuem a capacidade de fagocitar lipídios presentes no tecido (WASSEF et al., 1995). Outro estudo mostrou que após a administração de lipossomas, também constituídos por DCP, vazios ou com SbV em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, observou-se uma reação adversa, em que os autores sugeriram ser uma reação conhecida como pseudoalergia relacionada à ativação do sistema do complemento. Prostração, sialorreia e defecação foram os sinais mais frequentes observados (RIBEIRO et al., 2013). A formulação lipossomal referida anteriormente composta pelo fosfolípido DCP, foi alvo de estudo deste trabalho, e tem sido usada nas formulações de SbV pelo grupo de pesquisa do professor Frederic Frézard, do Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados (LabNano), do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais do qual fazemos parte.

### **1.3 Lipossomas e o tratamento das leishmanioses**

Como descrito anteriormente, os lipossomas têm sido empregados como um sistema carreador de fármacos e de outros bioativos. Dentre suas aplicações, destaca-se o seu uso no tratamento das leishmanioses, pelo uso de uma formulação lipossomal contendo anfotericina B, o Ambisome<sup>®</sup>, formada por fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) e colesterol, que tem mostrado bons resultados em humanos (RATH et al., 2003; FRÉZARD et al., 2005; LIMA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008). Assim, formulações lipossomais para o tratamento da leishmaniose apresentam vantagens quando comparadas aos fármacos livres, pois permitem o direcionamento do princípio ativo aos órgãos alvos da infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, como fígado, baço e medula óssea (ALVING, 1986; ADLER MOORE & PROFFITT, 2003; FRÉZARD et al., 2005; SCHETTINI et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008; BALASEGARAM et al., 2012).

Os compostos a base de SbV são os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses em países da América do Sul, Norte da África, Turquia, Bangladesh, Nepal e Índia e, dentre eles, o Antimoniato de Meglunina (MA ou

Glucantime<sup>®</sup>) e o gluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>). Porém, o tratamento é de longa duração, por via parenteral, diariamente, por no mínimo três semanas. Além disso, esses fármacos provocam vários efeitos adversos, como alterações hepáticas, renais, cardíacas, além de artralgia, mialgia, vômito, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, insônia, choque pirogênico e edema (RATH et al., 2003; LIMA et al., 2007; FRÉZARD & DEMICHELI, 2010).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está bem esclarecido. O que se tem proposto é que os antimoniais podem inibir a produção de adenosina (ATP) e guanosina trifosfato (ATG) no parasito por meio do bloqueio do ciclo do ácido cítrico, e também pelo fato do SbV ser reduzido, no interior dos macrófagos, à sua forma trivalente (SbIII), forma ativa e tóxica desse fármaco. Acredita-se também que a atividade leishmanicida do Sb possa se dever à ativação da resposta imune dos macrófagos do hospedeiro, assim como de uma ação direta no DNA do parasito, mediando a sua fragmentação, como acontece no mecanismo de apoptose. (RATH et al., 2003; LIMA et al., 2007; FRÉZARD & DEMICHELI, 2010).

O uso de formulações lipossomais com antimônio tem se mostrado mais eficiente que os antimoniatos na forma livre, além disso, uma dose muito menor em relação à forma livre é capaz de produzir melhores resultados (FRÉZARD et al., 2005; RIBEIRO et al., 2013). Assim, considerando os efeitos tóxicos e o desenvolvimento de resistência parasitária aos fármacos disponíveis, a Organização Mundial de Saúde incentiva a pesquisa de novos candidatos a fármacos com potencial leishmanicida e novas formulações lipossomais para o tratamento das leishmanioses e (FRÉZARD et al., 2005; FRÉZARD & DEMICHELI, 2010). Nesse sentido, desenvolver uma formulação lipossomal encapsulada com um fármaco leishmanicida, como o antimoniato de meglumina, e segura para o paciente, reduzindo os efeitos adversos observados, seria uma alternativa para tratar os indivíduos acometidos por essa doença.

## 2 INTERAÇÃO ENTRE LIPOSSOMAS E COMPONENTES SANGUÍNEOS

### 2.1 Hemólise

O sangue é composto de duas frações: o plasma e uma porção celular. O plasma corresponde a 55% do sangue, formado por 91,5% de água, 7% de proteínas e 1,5% de sais e substâncias orgânicas. A porção celular, composta por três linhagens, onde as hemácias, chamadas também de glóbulos vermelhos ou eritrócitos, quantitativamente são as mais abundantes quando comparadas às outras linhagens celulares, leucócitos e plaquetas. Seu número pode variar entre 4,5 – 6,0 milhões por microlitro de sangue (CARVALHO, W. F., 2008).

As hemácias por armazenarem uma importante proteína chamada hemoglobina, apresenta um papel fundamental nas trocas gasosas, levando o oxigênio ( $O_2$ ) adquirido pelo processo respiratório até os tecidos e a captação de gás carbônico ( $CO_2$ ) advindo das reações metabólicas dos tecidos para ser eliminado nos pulmões. (GUYTON & HALL, 2006; ALMEIDA et al., 2011; MCPHEE & GANONG, 2011). Para que o processo de troca gasosa possa acontecer, o  $O_2$  deve-se ligar ao grupo heme presente na molécula de hemoglobina. O grupo heme é um anel tetra pirrólico contendo um átomo central de ferro ( $Fe^{2+}$ ), o qual é de suma importância para a ligação do  $O_2$  à molécula de hemoglobina. Assim, a molécula de hemoglobina presente nas hemácias possui um papel fundamental no transporte de  $O_2$  e de cerca de 30% do  $CO_2$ . O restante do  $CO_2$  presente é transportado pelas hemácias via bicarbonato, resultante da dissociação do  $H_2CO_3$  formado pela reação de  $CO_2 +$  água, catalisada pela enzima anidrase carbônica. A presença de baixos níveis de hemoglobina, decorrente de uma variedade de causas provoca anemia, distúrbio hematológico muito comum encontrado na população em geral (ALMEIDA et al., 2011; MCPHEE & GANONG, 2011; GUYTON & HALL, 2006; MURADOR & DEFFUNE, 2007).

No ser humano, as hemácias têm uma vida média de aproximadamente 120 dias e uma baixa taxa de destruição fisiológica, já que, diariamente, somente 0,06% a 0,4% das hemácias são fisiologicamente retiradas da circulação (MCPHEE & GANONG, 2007). Alguns autores mostram que, em condições normais, pouco menos de 1% das hemácias são destruídas diariamente e substituídas por um número quase idêntico de células novas (PRINCE & SCHRIER, 2012).

As hemácias, por serem as células encontradas em maior quantidade na corrente sanguínea e por sua provável interação com formulações farmacêuticas administradas por via parenteral, como os nanocarreadores, são alvos de pesquisas para testes de toxicidade (DOBROVOLSKAIA et al., 2008; DASH et al., 2010; BENDER et al., 2012). Assim, uma forma de avaliar a ocorrência de reações adversas devido à interação entre as formulações farmacêuticas e componentes celulares do sangue é avaliar o grau de hemólise que tais formulações podem induzir. A indução de hemólise por sistemas nanoestruturados pode ser um fator de risco à saúde, uma vez que o resultado dessa interação pode levar a um quadro de anemia (DOBROVOLSKAIA et al., 2008; BERTRAND & LEROUX, 2012; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013). Nesse sentido, o teste de hemólise é de fundamental importância para estabelecer o grau de interação que novos produtos podem ter com as células vermelhas e se essa interação pode comprometer a sua estrutura, culminando em lise e liberação de seu conteúdo citoplasmático no plasma. Assim, uma das formas de estabelecer o dano causado às hemácias é a dosagem de hemoglobina liberada quando essas células são rompidas (DOBROVOLSKAIA et al., 2008; DASH, et al., 2010; TOMCZAK et al., 2010; BENDER et al., 2012).

Percebe-se que as hemácias, por conterem carga negativa, têm grande chance de interagir com partículas carregadas positivamente e assim, tais partículas podem contribuir para a desestabilização da membrana eritrocitária e lise dessas células (CARVALHO, W. F., 2008; DOBROVOLSKAIA et al., 2008; DASH, et al., 2010; BENDER et al., 2012). Por outro lado, quando se analisa a interação das hemácias com vesículas carregadas negativamente, verificam-se efeitos distintos. Foi observado que para duas formulações lipossomais carregadas em sua bicamada lipídica com os pró-fármacos de metotrexato e melfalano, respectivamente, foi observado que as taxas de hemólise encontradas não excederam em 2% em relação à taxa de hemólise de hemácias incubadas com PBS (0,15M NaCl, 0,01 M fosfato, pH 7,2), utilizadas como controle negativo (KUZNETSOVA et al., 2012). Este é o valor máximo permitido de hemólise preconizado pelo protocolo internacional E2524-08 (2013) - *Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles* da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) para o estudo das propriedades hemolíticas de nanopartículas (DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013).

## 2.2 Efeito sobre a coagulação

O processo da hemostasia sanguínea envolve diretamente a participação de vasos sanguíneos, plaquetas e fatores da cascata da coagulação (SIQUEIRA, 2001). Mediante de injúria do endotélio vascular, por exemplo, plaquetas são ativadas com o objetivo de formar um tampão plaquetário no local da lesão, evitando a perda de grandes quantidades de sangue. Paralelo à ativação plaquetária, a cascata da coagulação é ativada, promovendo a formação de um coágulo de fibrina, que, por sua vez, leva a uma maior retenção das plaquetas e à formação de um coágulo estável (SIQUEIRA, 2001; RIDDEL et al., 2007).

Didaticamente, o processo de avaliação da atividade da cascata da coagulação é dividido em duas etapas, uma representada pela avaliação da atividade da via intrínseca, e a outra representada pela avaliação da atividade da via denominada extrínseca. Ambas as vias convergem para a via comum, culminando assim com a formação de um coágulo estável de fibrina. Porém, é importante ressaltar que, no processo de formação do coágulo de fibrina, a ativação das plaquetas e dos fatores envolvidos na cascata da coagulação é disparada simultaneamente. Além disso, a presença de células como monócitos, fibroblastos e células endoteliais e subendoteliais que compõem os vasos sanguíneos é importante para que ocorra a ativação adequada do processo de coagulação (MACFARLANE, 1964; DAVIE & RATNOFF, 1964; FRANCO, 2001, SIQUEIRA 2001; FERREIRA et al., 2010).

Ao considerar que as formulações lipossomais são administradas por via endovenosa, é importante avaliar se as mesmas interagem com os componentes envolvidos na hemostasia sanguínea (OLIVEIRA, 1993; ADLER-MOORE & PROFFITT, 2003; RATH et al, 2003; SCHETTINI et al., 2005; SCHETTINI, 2006; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2007; KUZNETSOVA et al., 2012). Ao interagir tanto com plaquetas quanto com fatores da coagulação e células envolvidas neste mecanismo, formulações lipossomais e nanoestruturadas poderiam promover prolongamento ou rápida formação do coágulo sanguíneo. Essas características dependem diretamente da constituição dos componentes desses sistemas carreadores e de sua interação com os componentes envolvidos na cascata da coagulação (WASSEF, 1995; GALÁN et al., 2002; DOBROVOLSKAIA & NEUN, 2009; DOBROVOLSKAIA & NEUN, 2011; KUZNETSOVA et al., 2012).

### 2.3 Ativação Plaquetária

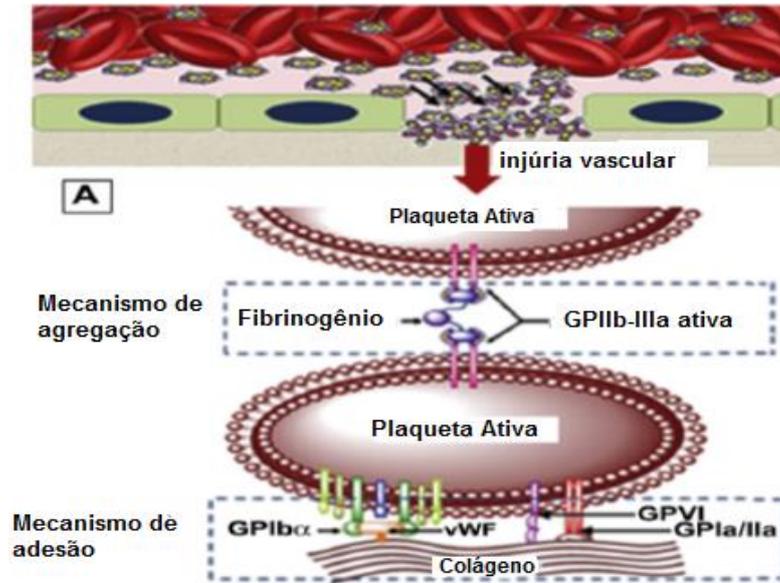
As plaquetas possuem uma importante função hemostática, a formação de uma superfície pró-coagulante, levando à formação de um tampão plaquetário no local da lesão do vaso sanguíneo. Além disso, as plaquetas podem ativar mecanismos da coagulação por expor em sua superfície fosfolípidios carregados negativamente que irão auxiliar na consolidação do coágulo de fibrina que está sendo formado (SIQUEIRA, 2001).

A primeira etapa após a injúria vascular é a adesão das plaquetas às macromoléculas presentes no tecido subendotelial (BEVERS, COMFURIUS, ZWAALL, 1991; SIQUEIRA, 2001; RIDDEL JR, 2007). Esse processo é favorecido pela presença do Fator de von-Willebrand (vWF, do inglês, *von Willebrand Factor*) presente no plasma, secretado pelas células endoteliais e pelas plaquetas, que ao se ligar às fibras de colágeno expõe domínios que se ligarão a receptores presentes na membrana das plaquetas, a glicoproteína Ib/IX, promovendo então a adesão plaquetária. Além do processo induzido pelo vWF, é descrito o papel de outras proteínas de adesão celular que favorecem a ligação das plaquetas às fibras de colágeno, como a fibronectina, a trombospondina, a laminina e a vitronectina (SHATTIL, 1993; JUNG & MOROI, 2000; CLEMETSON & CLEMETSON, 2001; LOWENBERG, MEIJERS & LEVI, 2010).

As células endoteliais lesadas liberam moléculas de ADP que possuem um papel fundamental no processo da coagulação iniciado pelas plaquetas. A simples presença das moléculas de ADP estimula as plaquetas a liberarem o seu próprio ADP, ampliando assim a formação do tampão plaquetário (SIQUEIRA, 2001). Após se ligarem às fibras de colágeno, as plaquetas tornam-se ativadas e sofrem um rearranjo do seu citoesqueleto com uma mudança de forma com emissão de pseudópodes e liberação de ADP. Esse processo irá levar à ativação da glicoproteína GPIIb-IIIa, expressa na membrana das plaquetas, que liga-se ao vWF e também ao fibrinogênio, promovendo a agregação plaquetária. Esse processo pode ser observado na figura 3, em que, após uma injúria vascular, as plaquetas se aglomeram ao sítio da lesão e promovem a formação de um tampão plaquetário. Além disso, a superfície das plaquetas ativadas acelera o processo de coagulação, proporcionando a estabilização do agregado de plaquetas pela ação da fibrina, resultante da atividade da cascata da coagulação. Após a formação do coágulo de fibrina, há também contração do coágulo

mediada pela atividade do complexo de glicoproteína GPIIb-IIIa (ANDREWS, LOPEZ, BERNDT, 1997; SIQUEIRA, 2001; ANDREWS, et al., 2003).

**FIG. 3: Adesão, ativação e agregação plaquetária.** No primeiro momento, as plaquetas se aderem às fibras de colágeno no tecido subendotelial por meio de receptores presentes em sua membrana, a glicoproteína Ib/IX e do vWF. Em seguida, acontece o processo de ativação e de agregação plaquetária, em que plaquetas ativadas ligam-se às moléculas de fibrinogênio através do seu receptor de membrana GPIIb-IIIa, culminando com a formação do tampão plaquetário.



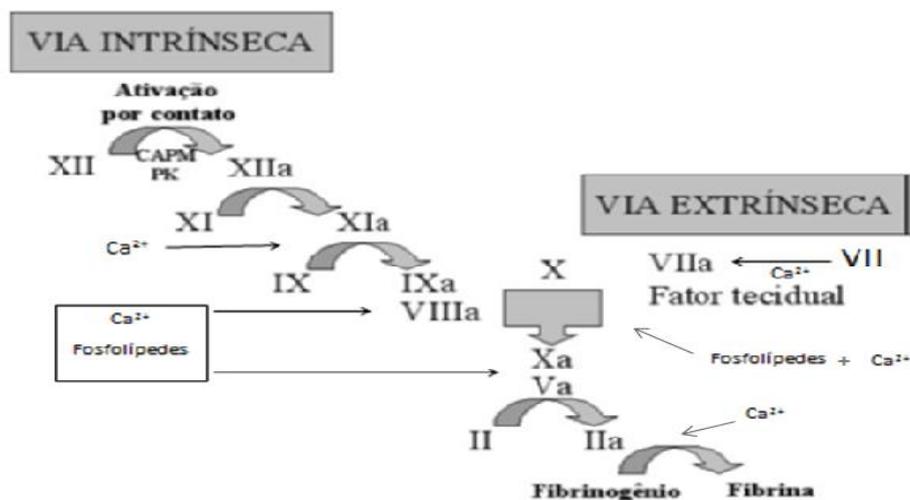
Fonte: MODERY-PAWLOWSKI et al., 2013.

## 2.4 Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)

Outra forma de avaliar laboratorialmente a atividade de uma das vias da cascata da coagulação sanguínea é por meio do teste do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa). Esse teste é baseado no modelo da cascata da coagulação, o qual analisa o tempo necessário para que ocorra a formação do coágulo de fibrina pela vias intrínseca e comum. Os fatores que atuam nessa via estão em estado inativo (zimogênios), mas assim que recebem um estímulo, são ativados e de maneira sequencial, em forma de cascata de reações enzimáticas, irão provocar a formação de um coágulo de fibrina (FRANCO, 2001; FERREIRA et al., 2010).

Para que ocorra a ativação dos fatores da cascata da coagulação da via intrínseca, é preciso que o primeiro fator desta via entre em contato com uma superfície contendo carga negativa para ser ativado. Além disso, para potencializar a ativação desse fator, é necessária a presença de pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular (FRANCO, 2001; WALSH, 2001). Assim, é disparada uma sequência de reações enzimáticas que atuando em cadeia, culmina com a formação do coágulo de fibrina. Esse esquema pode ser visto na fig. 4, que relaciona as vias envolvidas na cascata da coagulação (BOON, 1993; CARVALHO, 2008; ZAGO, 2005; FRANCO, 2001; FERREIRA et al., 2010).

**FIG. 4: Representação da cascata da coagulação:** a figura relaciona as vias intrínseca e extrínseca da coagulação que convergem para uma via comum pela ativação do fator X com conseqüente formação do coágulo de fibrina. **CAPM:** Cinogênio de Alto Peso Molecular; **PK:** Pré-caliceína.



Fonte: Adaptado de Franco, 2001.

## 2.5 Tempo de Protrombina (TP)

A avaliação realizada através da determinação do Tempo de Protrombina (TP) baseia-se na ativação das vias extrínseca e comum da cascata da coagulação (FERREIRA et al., 2010). Vale lembrar que o termo extrínseco é usado para designar uma proteína que não está presente no sangue circulante, o Fator Tecidual (FT), também chamado de Fator III ou tromboplastina. Esse fator torna-se exposto quando há uma lesão no vaso sanguíneo, uma vez que ele é uma glicoproteína de membrana encontrada na célula endotelial (BOON, 1993; FRANCO, 2001; RIDDEL et al., 2007; FERREIRA et al., 2010).

De maneira semelhante ao que acontece na via intrínseca da coagulação, a injúria vascular faz com que o FT sofra uma modificação estrutural expondo o domínio de ligação ao Fator VII (FVII), que na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , forma um complexo trimolecular, FT-  $\text{Ca}^{2+}$ -FVII. A formação desse complexo torna o FVII ativo (FVIIa) o qual, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos, irá ativar o Fator X (FX). A ativação da via extrínseca depende do Fator Tecidual e é mais rápida que a via intrínseca. Assim, a via extrínseca opera na superfície das células que expressam FT para iniciar e amplificar a cascata da coagulação. O Fator X ativado (FXa) na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolípidos e Fator V ativado (FVa) irá ativar a formação de trombina (FIIa), enzima responsável pela formação de monômeros de fibrina a partir do fibrinogênio. (BOON, 1993; KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005; ZAGO, 2005; RIDDEL et al., 2007; CARVALHO, 2008).

Tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca da coagulação convergem para uma via comum, como pode ser observado na figura 4. Ambas garantem a formação de fator Xa (ativo), que na presença de FVa,  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos convertem a protrombina em trombina. Como citado anteriormente, a trombina catalisa a proteólise do fibrinogênio em monômeros de fibrina que, espontaneamente, se associam por interações iônicas formando um polímero instável de fibrina. Além disso, a trombina ativa o Fator XIII (FXIII), que é convertido em FXIIIa (ativo) e de extrema importância na formação de ligações covalentes dentro do polímero de fibrina, formando a malha de fibrina instável em um polímero de fibrina estável e insolúvel. A pequena quantidade de trombina inicialmente formada pela atividade da via extrínseca e comum é essencial para ativar os cofatores FV e FVIII (Fator VIII), favorecendo uma

eficiente amplificação da cascata da coagulação (BOON, 1993; KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005; ZAGO, 2005; RIDDEL et al., 2007; CARVALHO, 2008).

Além de avaliar o papel dos fatores da cascata da coagulação tanto da via intrínseca, quanto da via extrínseca, algumas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de desenvolver formulações que possam estimular o processo de coagulação em pacientes que possuem deficiência em algum dos fatores envolvidos no processo de coagulação. Essas formulações são preparadas baseando-se na adsorção de proteínas plasmáticas a superfícies de vesículas lipossomais ou a partir da manipulação de fosfolipídios que compõem tais vesículas com características que possam ativar a formação do coágulo de fibrina (GALÁN et al., 1998; GALÁN et al., 2002; MODERY-PAWLOWSKI et al., 2013). No trabalho realizado por GALÁN et al., (2002), lipossomas contendo o fosfolipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foram capazes de provocar a ativação da coagulação demonstrado pelo aumento da deposição de fibrina no subendotélio de fragmentos da aorta de coelhos, assim como o aumento dos fragmentos 1+2 de protombina no plasma desses animais que tiveram o número de plaquetas reduzido.

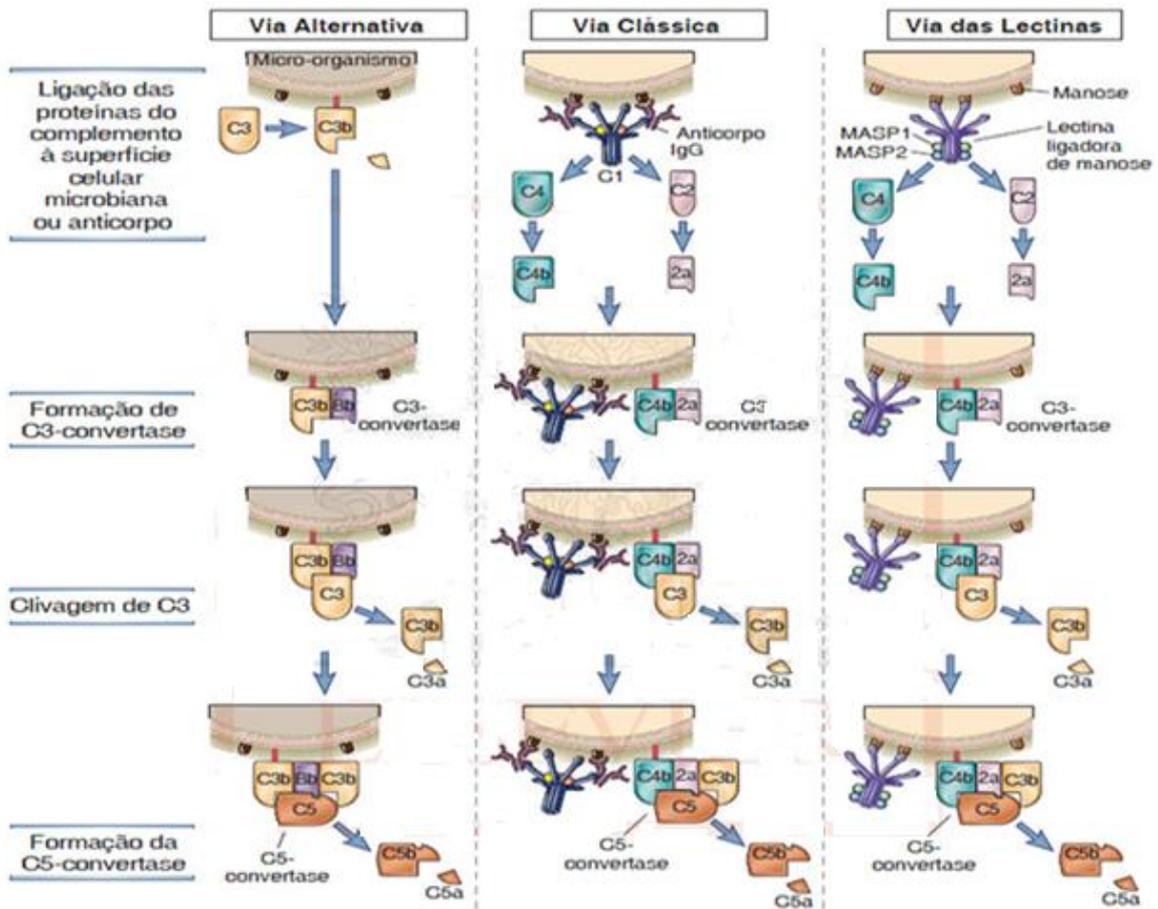
Por outro lado, é importante observar que a indução da formação de coágulo após a administração intravenosa de lipossomas apresenta um fator de risco à saúde. Neste sentido, é importante avaliar se tais formulações ativam a cascata da coagulação, uma vez que podem desencadear eventos tromboembólicos e ou a coagulação intravascular disseminada (DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013). Assim, KUZNETSOVA et al., (2012) mostrou, *in vitro*, que lipossomas carregados com metotrexato que possui carga negativa provocaram um prolongamento no tempo de coagulação, enquanto que formulações contendo melfalano, também com carga negativa, não induziram alterações nos parâmetros avaliados.

## 2.6 Ativação do Complemento

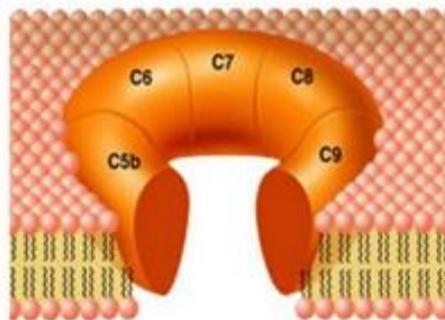
A ativação do sistema do complemento, além de ter um papel no aumento da captura por macrófagos, tem sido relacionada a efeitos adversos após administração de lipossomas no organismo. É descrito que a administração de formulações lipossomais por via endovenosa pode provocar uma reação chamada de pseudoalergia relacionada à ativação do complemento (*Complement Activation Related PseudoAllergy* - CARPA), em que sinais e sintomas de hipersensibilidade são observados (CHANAN-KAN et al., 2003). Dentre eles, podem ser citados taquipneia, sialorreia, midríase, miose, prostração, micção, tremor muscular, vômito e defecação. Essas reações foram observadas em cães infectados com *Leishmania infantum* quinze minutos após a administração intravenosa de lipossomas constituídos pelo fosfolípido DCP, contendo ou não o fármaco antimoniato de meglumina para o tratamento da infecção (RIBEIRO et al, 2008; RIBEIRO et al, 2013). Ao contrário da alergia clássica (hipersensibilidade do tipo I), essa reação não é mediada por anticorpos IgE, mas sim pela ativação do sistema do complemento (SZEBENI et al., 2000; CHANAN-KAN et al., 2003, SZEBENI, 2005; SZEBENI et al., 2012). Assim, uma das formas de avaliar a ativação do sistema do complemento é avaliar a formação de produtos da quebra de proteínas do complemento como C3a, C4a, dentre outros como pode ser visto na figura 5 (LIU, D. 1997; CHANAN-KAN et al., 2003; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013).

**FIG. 5: Sistema do complemento:** representação das vias de ativação do sistema do complemento e dos produtos gerados após a ativação de cada via. (A) Na figura abaixo, observa-se que o fragmento C3a, resultante da clivagem da proteína C3, é gerado nas etapas iniciais das três vias de ativação do sistema do complemento, Alternativa, Clássica e das Lectinas. (B) Do mesmo modo, no final da ativação desse sistema, percebe-se a formação de um complexo de proteínas, C5, C6, C7, C8 e C9, em forma de tubo, conhecido por complexo de ataque a membrana, o qual é capaz de formar poros na membrana celular e levar a lise de micróbios.

A)



B)



### 3 EFEITOS DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS SOBRE MACRÓFAGOS

#### 3.1 Captura por macrófagos

Após serem administrados por via endovenosa, os lipossomas convencionais, constituídos por fosfatidilcolina ou por outros fosfolipídios e por colesterol, são removidos da circulação por macrófagos do SFM (WOODLE & LASIC, 1992; WASSEF, 1995; AKBARZADEH et al., 2013; ALLENS & CULLIS, 2013). A fagocitose de lipossomas por macrófagos depende tanto de características relacionadas às propriedades físico-químicas das vesículas lipossomais, quanto da sua interação com proteínas plasmáticas e com as membranas celulares (SHARMA & SHARMA, 1997; BATISTA, CARVALHO E MAGALHÃES, 2007; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2007; BERTRAND & LEROUX, 2012).

Dentre os mecanismos responsáveis pela fagocitose por macrófagos, pode-se relatar a opsonização das vesículas por proteínas do complemento e por Ac. As vesículas recobertas pelas proteínas do complemento ou por anticorpos têm sua captura facilitada, uma vez que essas células possuem receptores para proteínas do complemento e para algumas classes de Ac (ISHIDA et al., 1997; LIU, 1997).

É descrito também que, além da participação do complemento e dos anticorpos, características físico-químicas como tamanho, forma, flexibilidade e carga superficial influenciarão na internalização desse sistema de vetorização. Neste sentido, é visto que vesículas de tamanhos maiores, mais rígidas e carregadas tanto positivamente quanto negativamente são mais fagocitadas por macrófagos do SFM (ISHIDA et al., 1997; SHARMA & SHARMA, 1997; CHEN et al., 2010; BERTRAND & LEROUX, 2012; FROHLICH, 2012). Assim, SUMIO et al., (2007) verificaram que, após a incubação *in vitro* de lipossomas com macrófagos NR8383, a captura foi maior quando se aumentava o tamanho das vesículas. No mesmo estudo, também foi descrito que lipossomas de 2000 nm tiveram maior taxa de fagocitose do que lipossomas de menores tamanhos por macrófagos alveolares de ratos após duas horas da administração dessas vesículas *in vivo*.

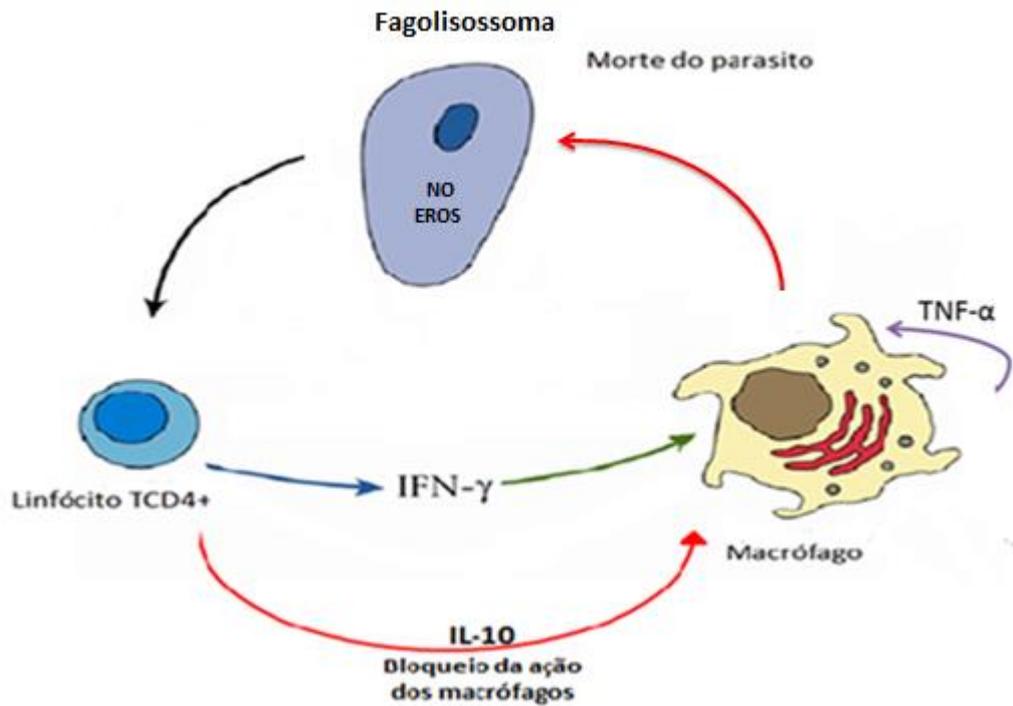
### 3.2 Resposta dos macrófagos na leishmaniose

É descrito que a evolução das leishmanioses irá depender da resposta imune do indivíduo frente à infecção pelo agente etiológico da doença. A citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), possui importante papel no recrutamento de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células reconhecidamente importantes na resposta imune a protozoários, assim como na ativação dos próprios macrófagos. Ao serem ativados, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> secretam a citocina IFN- $\gamma$  que age sobre os macrófagos, induzindo a produção de óxido nítrico e de espécies reativas do oxigênio nas vesículas de fagolisossomos, onde os protozoários do gênero *Leishmania spp* se encontram após serem fagocitados (REIS et al., 2006; BHATTACHARJEE et al., 2009; KUMAR & NYLÉN, 2012).

O óxido nítrico (NO) é conhecido como um mediador da resposta inflamatória e é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (KORHONEN et al., 2005). O NO é um gás e age como um radical livre, principalmente em espécies com elétrons desemparelhados (MAYER & HEMMENS, 1997). Níveis aumentados de óxido nítrico em macrófagos estão diretamente relacionados com a destruição das formas amastigotas de *Leishmania* e o controle da infecção (Fig.6). Por outro lado, quando este composto encontra-se em baixos níveis, observa-se uma tendência à resistência parasitária e uma dificuldade em controlar a infecção. (BACELLAR & CARVALHO, 2005; LIESE et al., 2008; BANERJEE et al., 2011).

Já a produção de IL-10 por linfócitos TCD4<sup>+</sup> e também por macrófagos é conhecida por seu efeito modulador, induzindo uma ação anti-inflamatória. Sua ação consiste em inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de superfície celular em macrófagos e outras células, as quais possuem ação importante na transdução de sinais que levam ao desenvolvimento de uma resposta imune, favorecendo assim a sobrevivência do parasito (CONTI et al., 2003; BHATTACHARJEE et al., 2009).

**FIG. 6: Ativação de macrófagos:** o efeito das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 sobre os macrófagos. Nela pode-se perceber a ativação de macrófagos com consequente produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas do oxigênio (EROS) em fagolisossomas pela ação das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Já a produção da IL-10 inibe a inibe a ação de macrófagos com posterior bloqueio da produção de óxido nítrico.



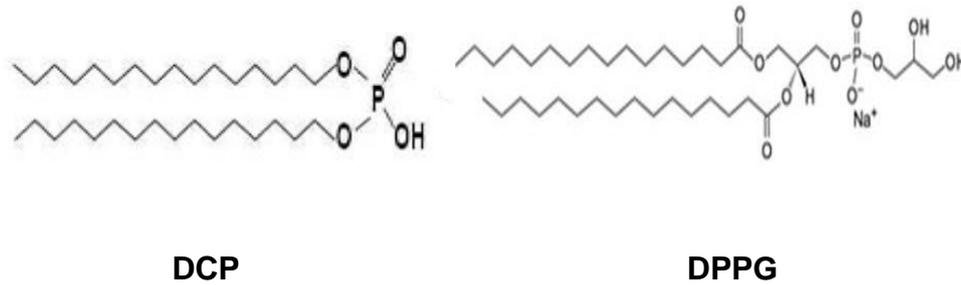
**Fonte:** Adaptado de *Protozoan and Helminth Parasites*, 2010.

### 3.3 Lipossomas contendo dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)

Vários fosfolípidios podem ser usados em formulações lipossomais e, dentre eles, uma das formulações lipossomais atualmente em estudo por nosso grupo de pesquisa, coordenado pelo professor Frederic Frezárd (UFMG), é composta por DSPC/CHOL/DCP. Como já relatado por pesquisas realizadas pelo grupo, a formulação apresenta-se promissora para o tratamento da leishmaniose, o que foi mostrado pela redução da infecção parasitária em testes com cães e camundongos infectados por parasitos do gênero *Leishmania* (SCHETTINI et al., 2003; SCHETTINI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2008; FERREIRA et al., 2013). Porém, reações adversas, como citado anteriormente, foram observadas quinze minutos após a administração intravenosa desses lipossomas em cães infectados por *Leishmania infantum*. Acredita-se que as reações observadas podem estar ligadas à ativação do sistema do complemento, em uma reação conhecida por CARPA (RIBEIRO et al., 2013). Além disso, alterações hematológicas e teciduais foram observadas em macacos após a administração de lipossomas contendo o fosfolípido DCP (WASSEF, 1995).

Na tentativa de reduzir os efeitos descritos, outro fosfolípido foi proposto pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Frederic Frezárd em substituição ao DCP. Assim, uma formulação contendo dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) (fig.7) foi preparada com o objetivo de reduzir os efeitos tóxicos observados da formulação lipossomal constituída por DCP. O DPPG, assim como o DCP, é um fosfolípido carregado negativamente e, além disso, apresenta boa biocompatibilidade e pode ser encontrado comercialmente em grau farmacêutico (MESTRES et al., 1998; MANSOUR et al., 2001; SOUZA, 2013).

**FIG. 7: Estrutura molecular dos fosfolípidios dicetilfosfato (DCP) e dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)**



**Fonte:** KIM et al., 2013; Avanti Polar Lipids, Inc.

Dessa forma, estudar os efeitos que esse sistema de vetorização pode estabelecer após sua administração é relevante, uma vez que tais estudos podem fornecer dados de sua segurança ao interagir com o organismo. Assim, o presente trabalho teve por objetivo analisar o efeito de duas formulações lipossomais vazias, uma contendo o fosfolípido DCP e outra composta pelo fosfolípido DPPG em substituição ao DCP, sobre a integridade das hemácias, sobre a atividade plaquetária, hemostática e ativação do complemento. Além disso, avaliou-se o efeito dessas formulações sobre a viabilidade celular de uma linhagem de macrófagos de camundongo, J774.A1, e se estas formulações possuem efeito sobre a produção de NO, um mediador importante para a destruição da *Leishmania*.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar por meio de testes *in vitro* o efeito de duas formulações lipossomais vazias contendo os fosfolipídios DCP ou DPPG sobre parâmetros hematológicos e imunológicos.

### **4.2 Objetivos Específicos:**

**4.2.1** Avaliar o efeito das formulações lipossomais sobre a viabilidade de hemácias e doseamento de hemoglobina;

**4.2.2** Avaliar o efeito das formulações sobre a hemostasia primária através da determinação do número de plaquetas;

**4.2.3** Analisar o efeito das formulações lipossomais sobre a atividade da via intrínseca e extrínseca da coagulação pelos testes Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (TTPa) e Tempo de Protrombina (TP);

**4.2.4** Verificar o efeito das formulações sobre a ativação do sistema complemento através da quantificação dos níveis do fragmento C3a e do complexo terminal SC5b-9;

**4.2.5** Avaliar o efeito das formulações sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico por uma linhagem de macrófagos (J774.A1).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Amostras

Nesse trabalho, foram utilizadas amostras sanguíneas coletadas, após o consentimento voluntário, de pacientes atendidos pelo Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição sob o número 458.230 após a submissão do trabalho na Plataforma Brasil.

As amostras foram consideradas viáveis somente quando atendessem os critérios estabelecidos no questionário de entrevista aplicado a cada voluntário (Apêndice B).

### 5.2 Preparo e caracterização das formulações lipossomais (DPC e DPPG) – vazias

O preparo das formulações lipossomais foi feito de acordo com protocolo descrito por SOUZA et al., (2013) e realizado no Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados (LabNano) do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os lipossomas foram produzidos pela técnica *Freeze-Dried Empty Liposomes* (FDEL) (FRÉZARD et al., 2000) e constituídos de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) (Lipoid, Alemanha), colesterol (CHOL) e pelo fosfolípido dicetilfosfato (DCP) ou pelo fosfolípido dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) (Sigma Aldrich Inc., EUA), utilizando a razão molar de 5:4:1 e concentração final de lipídeo de 55 g/L.

Para o preparo das formulações lipossomais, os lipídios foram pesados e solubilizados em clorofórmio em balão de fundo redondo. Em seguida, a solução foi levada ao evaporador rotatório, à temperatura de 50°C por 40 minutos, para evaporação do solvente e formação do filme lipídico. Após essa etapa, o filme lipídico formado foi hidratado com 5 mL de água destilada e novamente levado ao evaporador rotatório à temperatura de 65°C por 60 minutos para a formação de lipossomas multilamelares. Logo depois, os lipossomas formados foram submetidos a 5 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido por 3 minutos seguido de banho-maria a 65°C por 5 minutos, a fim de romper as camadas das vesículas

multilamelares. Em seguida, os lipossomas foram extrusados 10 vezes em membrana de policarbonato de poro de 100 nm para a uniformização do tamanho das vesículas.

Após a extrusão das vesículas lipossomais, as amostras foram caracterizadas pela medida de tamanho, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta no aparelho Zetasizer Nano (Malvern, Reino Unido). Para a determinação do tamanho e do IP as amostras foram dispersas em água destilada, e para a determinação do potencial zeta, os lipossomas foram dispersos em PBS, pH = 7,2. Após a extrusão, foi adicionada sacarose as formulações na relação de 3 g do açúcar por g de lipídeo, como criopreservante. Após a adição de sacarose, foi realizado o congelamento dos lipossomas em nitrogênio líquido e subsequente liofilização por um período de 24 horas (Liofilizador modelo FreeZone 4.5, Labconco Corp., EUA).

### 5.3 Determinação das concentrações lipossomais (DCP e DPPG)

As concentrações lipossomais utilizadas nos testes foram calculadas com base no trabalho de RIBEIRO et al. (2013), onde observou-se reações adversas após a administração de lipossomas em cães. Esses estudos foram realizados com antimoniato de meglumina lipossomal (6,5 mg antimônio/kg) para o tratamento de cães infectados por parasitos do gênero *Leishmania*. Nestes lipossomas, tem-se uma relação de 0,25 g Sb/g de lipídeo. Assim, tem-se uma concentração de 26 mg de lipídeos/kg. A partir das informações acima, foi realizada a conversão da dose utilizada em cães para humanos, seguindo o protocolo preconizado pela *Food and Drug Administration (FDA)* de 2005: *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting dose in initial Clinical Trials for Therapeutic in Adult Health Volunteers*. Dessa forma, o cálculo para a conversão das doses foi feito utilizando as seguintes fórmulas:

$$Km = (kg \div m^2)$$

Onde Km é o fator de conversão da dose em mg/Kg para a dose em mg/m<sup>2</sup>;

Kg= peso do cão (em, kg);

m<sup>2</sup>= área corporal do cão;

Em média, tem-se os seguintes valores para cães:

10 kg e 0,5 m<sup>2</sup> de área corporal.

Assim tem-se:  $Km = 10 \text{ kg} \div 0,5 \text{ m}^2 = 20$

$$\text{Dose humana (mg/kg)} = \frac{\text{Dose animal (mg/kg)} \times km \text{ animal}}{Km \text{ humano}}$$

Onde:

$Km \text{ animal} = 20$

$Km \text{ humano} = 37$

Seguindo a fórmula, temos:  $\text{Dose humana (mg/Kg)} = \frac{(26 \text{ mg/Kg} \times 20)}{37}$ ;

Dose humana: 14,1 mg/Kg.

A partir da dose encontrada, estipulou-se sete concentrações a serem utilizadas nos estudos sobre a influência dos lipossomas sobre hemácias, plaquetas e sistema da coagulação. As concentrações foram estimadas para um volume final de 1000  $\mu\text{L}$  de reação, baseando-se na manutenção inicial da concentração de lipídios e sacarose e levando-se em conta o peso médio de um indivíduo adulto, 75 Kg, e volume sanguíneo de 5 litros (LORENZI, T., 2011). Dessa forma, chegou-se às seguintes concentrações de lipossomas por mL de sangue/plasma: 60,0  $\mu\text{g}$ ; 120,0  $\mu\text{g}$ ; 180,0  $\mu\text{g}$ ; 240,0  $\mu\text{g}$ ; 300,0  $\mu\text{g}$ ; 360,0  $\mu\text{g}$  e 420,0  $\mu\text{g}$ .

#### **5.4 Diluição dos lipossomas liofilizados: preparo das formulações vazias**

Os lipossomas liofilizados preparados na UFMG foram reconstituídos de modo a manter a concentração de sacarose em 0,3 M e a concentração de lipídios obtida antes da liofilização. Dessa forma, foram reconstituídos 2 mg do liofilizado, acrescentando-se 14,62  $\mu\text{L}$  de água destilada para formar as vesículas lipossomais e, em seguida, foram adicionados 985,38 de  $\mu\text{L}$  PBS. A partir dessa solução, foram preparadas as amostras com as concentrações lipossomais estabelecidas para o estudo.



2 mg de lipossomas + 14,62  $\mu$ L água destilada + 985,38  $\mu$ L de PBS.

## 5.5 Ensaio de atividade hemolítica

O ensaio da atividade hemolítica foi realizado adaptando-se a metodologia descrita por VALADARES et al., (2012). Adicionalmente, após a incubação das diferentes concentrações de lipossomas com sangue total, a concentração de hemoglobina (Hb) liberada foi determinada pela reação com o reagente de Drabkin, que dá origem à cianometahemoglobina, de acordo com o trabalho de DOBROVOLSKAIA & NEUN, (2009). A detecção da cianometahemoglobina foi realizada em leitor de ELISA, usando o comprimento de onda de 570 nm e sua concentração foi quantificada pela comparação como uma solução padrão de hemoglobina obtida comercialmente (Labtest Diagnóstica SA).

Foi construída uma curva padrão, de acordo como a metodologia proposta por CARVALHO (2008), baseando-se no princípio da fragilidade osmótica das hemácias, pela incubação de sangue total com diferentes concentrações de PBS e água. Assim, baseado no fenômeno osmótico, a água se desloca do meio menos concentrado para o mais concentrado, na tentativa de manter o meio em equilíbrio. Dessa forma, ao diminuir a concentração de sal na suspensão de hemácias, a água presente no meio tende a deslocar para o interior das células, pois seu interior encontra-se mais concentrado em relação ao meio externo. As hemácias, então, tem seu volume aumentado, o que pode culminar com a ruptura de sua membrana, liberando seu conteúdo citoplasmático no meio, dentre eles a molécula de hemoglobina.

Neste sentido, para a realização do teste de hemólise, foram coletadas amostras de sangue de voluntários com tipo sanguíneo O<sup>+</sup> em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Em seguida, foi realizada uma curva para determinar o grau de hemólise obtido pela incubação de hemácias com diferentes concentrações de PBS e água a 37°C por 1 hora. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 1.500 x g por cinco minutos e 80  $\mu$ L do sobrenadante de cada tubo foi transferido para uma

placa de ELISA de 96 poços. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância em 570 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices – Emax). O esquema da construção da curva padrão pode ser visualizado na tabela abaixo.

**Tabela 2: Curva de hemólise:** curva construída pela incubação de sangue total de voluntários O<sup>+</sup> com diferentes volumes de água e PBS para determinar a porcentagem de hemólise das amostras.

Porcentagem de hemólise	Sangue Total (µL)	Água destilada (µL)	PBS (µL)
100%	100	100	0
80%	100	80	20
60%	100	60	40
40%	100	40	60
20%	100	20	80
0%	100	0	100

Os lipossomas liofilizados foram reconstituídos conforme explicitado no item 5.4, e, em seguida, a formulação lipossomal foi diluída para uma concentração de 1mg de lipossomas por mL. Assim, para as concentrações de 60,0 µg, 120,0 µg, 180,0 µg, 240,0 µg, 300,0 µg, 360,0 µg e 420,0 µg das formulações lipossomais, foram retirados 6,0 µL, 12,0 µL, 18,0 µL, 24,0 µL, 30 µL, 36 µL e 42 µL e completando com PBS para um volume final de 100 µL (Tabela 3).

Para avaliar o efeito dos lipossomas sobre as hemácias, as diferentes concentrações das formulações lipossomais foram incubadas com 100 µL de sangue total a 37°C por 1 hora. Seguiu-se então com a centrifugação das amostras a 1.500 x g por 5 minutos, transferência de 80 µL do sobrenadante para uma placa de ELISA de 96 poços e determinação da absorbância em 570 nm em leitor de ELISA. Além disso, o valor da absorbância de cada teste foi corrigido subtraindo-se o valor da absorbância do teste pelo valor da absorbância de amostras preparadas como branco, as quais foram preparadas pela incubação de sangue total e substituindo-se o volume de cada concentração lipossomal pelo mesmo volume de uma solução de água e PBS.

**Tabela 3: Teste de atividade hemolítica:** volumes utilizados de sangue total, lipossomas e PBS. Para cada concentração lipossomal, o volume de PBS utilizado foi obtido subtraindo-se o valor de 100  $\mu\text{L}$  de PBS pelo volume das amostras lipossomais utilizado em cada concentração testada.

<b>Sangue Total</b>	<b>Amostras (volume)</b>	<b>PBS</b>
100 $\mu\text{L}$	x $\mu\text{L}$	100- x $\mu\text{L}$

Para se calcular a porcentagem de hemólise da curva padrão, foi usada regra de três simples, relacionando a leitura de absorbância e a porcentagem de hemólise para cada ponto da curva:

Tubo 1: 0,250 (absorbância) ----- 100% de hemólise

Tubo 5: 0,150 (absorbância) ----- X% de hemólise

Logo, X= 60% de hemólise.

Também, foi realizada uma curva padrão para a quantificação da hemoglobina liberada no sobrenadante. A curva foi montada a partir da diluição seriada de um padrão de hemoglobina de concentração conhecida e em seguida determinada a absorbância de cada ponto da curva.

Padrão de hemoglobina a 1,0 g/dL ----- 0,220 (absorbância)

X g/dL ----- 0,040 (absorbância)

X = 0,182 g/dL de hemoglobina,

Onde X representa um ponto da curva padrão.

A concentração de hemoglobina nos testes foi quantificada pela comparação pela incubação de 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante com 80  $\mu\text{L}$  de Reagente de Drabkin, o qual reage com a Hb presente na amostra.

A partir da curva padrão obtida tanto para porcentagem de hemólise, quanto para a concentração de hemoglobina, foi obtida, por regressão linear, a equação da reta e determinada a porcentagem de hemólise e a concentração de hemoglobina dos testes realizados.

## **5.6 Avaliação do efeito das formulações lipossomais sobre a cascata da coagulação**

O efeito das formulações lipossomais sobre a cascata da coagulação foi avaliada de forma automatizada (coagulômetro Humaclot Jr. – Human) segundo as metodologias descritas por BENDER et al., (2012) e KUZNETSOVA et al., (2012), nas quais foram avaliados o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) e o Tempo de Protrombina (TP) após a incubação prévia de lipossomas com amostras de plasma obtidas de sangue coletado com citrato. Os resultados obtidos com amostras previamente incubadas com lipossomas foram comparados com o resultado obtido com plasma não tratado.

As diferentes concentrações das duas formulações lipossomais foram incubadas por dez minutos com plasma humano em banho-maria a 37°C. Logo em seguida, seguiu-se com a realização dos testes utilizando-se reagentes comerciais (In Vitro Diagnóstica Ltda) a fim de determinar o tempo necessário para a formação do coágulo.

Os testes foram realizados, incubando as formulações com plasma humano na relação de 1:9. Logo em seguida, as amostras foram incubadas por dez minutos e depois foram realizados os testes de Tempo de Protrombina e Tempo Tromboplastina Parcial ativado. Como controle negativo para os testes de coagulação, a mesma relação de PBS e plasma humano foi utilizada, mantendo-se as amostras controles sob as mesmas condições que as amostras testes e, assim, determinados os TP e TTPa.

### **5.6.1 Tempo de Protrombina (PT)**

Os testes foram realizados de acordo com as orientações do fabricante dos reagentes para a determinação do Tempo de Protrombina (InVitro Diagnóstica Ltda – *Hemostat Thromboplastin-SI*). O reagente consiste do reagente Thromboplastin SI liofilizado, contendo extrato de cérebro de coelho > 10% e azida sódica <0,01% em tampão contendo cloreto de cálcio e azida sódica a 0,01%. Assim, 25 µL das diferentes concentrações de lipossomas diluídas em plasma foram incubados por 3 minutos a 37°C. Logo depois, 50 µL do reagente aquecido a 37° C por 5 minutos foram adicionados à amostra teste e, imediatamente, homogeneizados e marcado o tempo

até a formação do coágulo. Os resultados do TP foram apresentados como média de TP  $\pm$  desvio padrão do tempo de formação do coágulo para cada concentração das formulações testadas.

### **5.6.2 Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)**

O teste de TTPa foi realizado segundo as recomendações do fabricante (InVitro Diagnóstica Ltda- Hemostat aPTT-EL). Dessa forma, foram adicionados em um tubo 25  $\mu$ L das amostras testes e 25  $\mu$ L do reagente 1 (extrato cloroformizado de cérebro de coelho <1,0%, ácido elágico a 0,0037%, tampão e azida sódica <0,01%), presente no kit de TTPa, seguido de incubação por 2 minutos a 37°C. Após 2 minutos de incubação das amostras testes com o reagente 1, acrescentou-se 25  $\mu$ L do reagente 2 (cloreto de cálcio a 0,02mol/L e azida sódica 0,1%), previamente aquecido a 37 °C, ao tubo e as amostras foram homogeneizadas até que fosse observado a presença do coágulo. Em seguida, foi anotado o tempo necessário para a formação do coágulo. Os tempos de coagulação foram dados como média do tempo de coagulação de cada amostra após incubação com as diferentes concentrações lipossomais.

## **5.7 Efeito dos lipossomas sobre a contagem de plaquetas**

Para avaliar se as formulações lipossomais exercem algum efeito sobre a ativação e agregação plaquetária foi realizada uma análise do número de plaquetas que permanecem em suspensão após incubação de uma amostra de plaquetas com as diferentes concentrações de cada formulação. A redução do número de plaquetas em suspensão é um indicativo da agregação plaquetária (BENDER et al, 2012).

A metodologia utilizada para verificar o efeito das formulações lipossomais sobre as plaquetas foi realizada de acordo com o protocolo descrito por BORN & CROSS, (1963, 1964); BENDER et al, (2012) e DOBROVOLSKAIA & NEUN, (2009). O número de plaquetas foi analisado em contador hematológico após a incubação das diferentes concentrações das duas formulações lipossomais com uma solução concentrada de plaquetas e comparação com as amostras controle.

Para obter o concentrado de plaquetas, foi coletado sangue humano por punção venosa, em tubos siliconizados contendo EDTA. Em seguida, as amostras

sanguíneas foram centrifugadas a 300 xg por 10 minutos em temperatura ambiente, a fim de se obter Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Logo em seguida, o PRP foi novamente centrifugado a 640 g por 10 minutos sob a mesma temperatura para que fosse separado o plasma das plaquetas. As plaquetas que ficaram no fundo do tubo foram cuidadosamente lavadas por três vezes com 5 mL de Tampão A (Tris-HCl 20 mM; glicose 100 mM, citrato de sódio 13 mM, KCl 5mM e NaCl 150mM, pH 7,5). Após cada lavagem, o tubo contendo o concentrado de plaquetas foi centrifugado a 640 xg por 10 minutos a 30°C. Após o término desse processo, foi preparada uma suspensão de plaquetas ( $2,5 \times 10^8$  plaquetas/mL) em uma segunda solução tamponada, denominada Tampão B (Tris-HCl 20 mM; glicose 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl 5 mM e NaCl 150 mM, pH 7,5 )

A fim de avaliar o efeito dos lipossomas sobre as plaquetas, 30 µL de cada concentração lipossomal foram adicionados a 270 µL do concentrado de plaquetas e, em seguida, incubados por 10 minutos, a 37°C, sobre leve agitação. Como controle negativo, foram adicionados 30 µL de Tampão B à suspensão de plaquetas e também incubados por 10 minutos a 37°C, sobre leve agitação. Como indutora da agregação plaquetária, a trombina foi utilizada como um controle positivo, acrescentando-se 30 µL de trombina (1UI/mL) a 270 µL do concentrado de plaquetas e a amostra incubada sob as mesmas condições dos testes anteriores. Após o período de incubação, cada teste foi analisado em triplicata (n=3) e então, determinado o número de plaquetas em contador hematológico automatizado (KX-21N- Sysmex) (WENDLAND, FARIAS & MANFROI, 2009, BENDER et al, 2012).

## **5.8 Efeito das formulações lipossomais sobre a ativação do sistema do complemento**

### **5.8.1 Quantificação dos níveis de C3a**

A ativação do sistema do complemento pelas vias clássica, alternativa e da lectina provoca a clivagem do componente C3 do complemento com a formação do fragmento C3a. É visto que o C3a desempenha papel fundamental na quimiotaxia de células inflamatórias e também numa reação de hipersensibilidade relacionada à ativação do complemento (KUZNETSOVA et al., 2012; SZEBENI et al., 2000; SZEBENI et al., 2011; SZEBENI et al., 2012, VAN DEN HOVEN et al., 2013). Dessa

forma, a dosagem de C3a após a incubação das formulações lipossomais com amostras de soro humano se torna de grande importância na investigação da ativação do sistema do complemento, uma vez que esse fragmento é formado em todas as vias desse sistema.

Os níveis de C3a foram quantificados de acordo com procedimento determinado pelo fabricante do kit (QUIDEL- C3a Plus EIA Kit). Amostras de soro humano foram obtidas de pacientes voluntários do Laboratório Piloto de Análises Clínicas da UFOP. Cada amostra foi submetida à incubação com a dose de 180 µg/mL de cada formulação lipossomal por trinta minutos à temperatura ambiente. A dose utilizada foi obtida pela conversão da dose em que foram observadas alterações em cães para a dose a ser utilizadas em testes em humanos, como demonstrado no item 5.3. Para a realização do teste, as amostras foram diluídas cinco mil vezes com o diluente de amostras contido no kit. Foram adicionados a cada poço sensibilizado com anticorpos anti C3a: 100 µL do branco, padrões, controles e das amostras testes e, logo depois, a placa foi incubada por uma hora à temperatura ambiente. A seguir, a placa foi lavada por quatro vezes com solução de lavagem. Após essa etapa, foram adicionados 100 µL do conjugado de C3a (anticorpo policlonal anti C3a conjugado a peroxidase) e a placa novamente incubada por mais uma hora em temperatura entre 18 a 25°C. A seguir, a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem. Logo depois, acrescentou-se 100 µL do substrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina – TMB- e peróxido de hidrogênio) à placa, que foi incubada por 15 minutos entre 18 a 25°C. Após esse tempo, 100 µL de solução de parada foram acrescentados em cada poço na mesma ordem em que foi adicionado o substrato e a placa gentilmente agitada para o desenvolvimento de cor. Em seguida, a absorbância das amostras foi determinada pela leitura no comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA dentro de 60 minutos após a adição da solução de parada e fazendo a correção das leituras com o branco. A determinação da concentração das amostras e controles foi feita de acordo com a curva padrão obtida.

### **5.8.2 Quantificação dos níveis do complexo SC5b-9**

O complexo C terminal ligado à proteína S (solúvel), SC5b-9, é formado como consequência da ativação do sistema do complemento (KUZNETSOVA et al., 2012).

Da mesma forma como verificado para a formação do fragmento C3a, o complexo SC5b-9 é produzido pela ativação de qualquer uma das vias do sistema do complemento e representa o final da ativação desse sistema. O complexo SC5b-9 é resultante da ligação dos fatores do complemento C5b a C9 com uma proteína sérica, a proteína S (MULLER-EBERHARD, 1984; SZE BENI et al., 2011).

Para a quantificação do complexo SC5b-9, amostras de soro foram diluídas quarenta vezes em diluente de amostras presente no kit (QUIDEL – SC5b-9 Plus) e depois incubadas com a concentração de 180 µg/mL das formulações lipossomais por trinta minutos sob refrigeração. Em seguida, a placa sensibilizada com anticorpo de camundongo anti-SC5b-9 humano foi reidratada com 300 µL solução de lavagem do kit. Para isso, a placa foi incubada com solução de lavagem por dois minutos entre 15-30° C. Logo depois, a solução foi aspirada de cada poço. A seguir, placa foi invertida e batida firmemente em papel absorvente duas vezes para remover algum líquido que pudesse permanecer dentro dos poços reidratados. Após essa etapa, em poços apropriados, adicionou-se 100 µL do branco, 100 µL dos padrões presentes nos kits e 100 µL dos controles do complexo SC5b-9 e 100 µL das amostras testes diluídas. A placa então foi incubada por um período de uma hora entre 15 e 30° C. Em seguida, foi removido o líquido presente em cada poço da placa e adicionado 300 µL de solução de lavagem. A placa foi então incubada por mais um minuto entre 15 a 30° C. Novamente, o líquido presente em cada poço foi removido e foram adicionados 300 µL de solução de lavagem aos poços da placa. Em seguida, retirou-se o líquido presente na placa. Essa etapa foi repetida por mais três vezes. Após o processo de lavagem, a placa foi novamente invertida e batida sobre papel absorvente duas vezes para que fosse removido algum líquido remanescente. Em seguida, adicionou-se a cada poço 50 µL do conjugado de SC5b-9 (anticorpo de cabra anti SC5b-9 conjugado à peroxidase) e a placa foi incubada por 30 minutos entre 15-30°C. Após esse período, a placa foi lavada novamente por cinco vezes como descrito acima. Imediatamente após esse passo, acrescentou-se 100 µL da solução substrato (TMB) a cada poço e placa incubada por 30 minutos entre 15 a 30° C. Logo depois, adicionou-se 100 µL da solução de parada e a placa foi cuidadosamente agitada para dispersar uniformemente a cor formada. Em seguida, foi realizada a determinação da absorbância no comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA, dentro de 30 minutos após a adição da solução de parada. A correção das absorbâncias foi

realizada, descontando o valor de absorvância do branco. A concentração das amostras e controles foi determinada a partir da curva padrão.

### **5.9 Cultura de macrófagos J774. A1**

Macrófagos murinos da linhagem J774-A1 foram gentilmente cedidos pela professora Maria Terezinha Bahia da UFOP. As células foram cultivadas em garrafas plásticas de cultura (TPP, Suíça) em meio DMEM – *Dulbecco's Modified Eagles's Medium – high glucose* (Sigma-Aldrich, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB; LGC Biotecnologia, Brasil), 100 U/mL de penicilina G (Sigma-Aldrich, Brasil), 2 mM de L-glutamina (GIBCO BRL), HEPES 1M (Sigma-Aldrich), 2-mercaptoetanol a 50  $\mu$ M (Plus One – Pharmacia Biotech), pH 7,2 em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Para a realização dos experimentos, os macrófagos foram coletados dos frascos utilizando raspador de células (*cell scraper*) e a sua contagem realizada em câmara de Neubauer após diluição em azul de tripan. As culturas celulares foram consideradas viáveis para a realização dos experimentos quando apresentavam viabilidade igual ou superior a 80% após contagem em azul de tripan.

### **5.10 Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após o tratamento com as formulações lipossomais vazias**

Para avaliar o efeito das formulações lipossomais sobre a produção de NO pelos macrófagos, inicialmente foi avaliado o efeito das formulações sobre a viabilidade de macrófagos J774, usando o ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2.5-difenil tetrazólio) de acordo com os trabalhos de MOSMANN et al., (1983); SIEUWERTS et al., (1995) e CAPELARI – OLIVEIRA et al., (2011). Os testes foram realizados na presença e ausência de soro fresco humano (5%). Como descrito anteriormente, componentes presentes no soro promovem a opsonização das vesículas lipossomais e podem interferir na interação dos lipossomas com as células SFM. Assim, 1 x 10<sup>5</sup> células/poço foram adicionadas em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça) e mantidas por duas horas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> para adesão das células ao fundo do poço. Após este período, os poços foram lavados com 200  $\mu$ L de PBS estéril para retirar as células que não aderiram e, em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L de DMEM contendo 10% SFB em todos os poços. Logo

depois, foram adicionados a cada poço 50 µL das diferentes concentrações das formulações lipossomais previamente diluídas em série em DMEM 10% SFB. As placas foram incubadas por um período de 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

A fim de eliminar a interferência das vesículas lipossomais na leitura da absorbância, após o período de incubação, o sobrenadante de cada poço foi coletado e todos os poços lavados duas vezes com 200 µL de PBS estéril. Logo depois, 100 µL de DMEM 10% SFB e 20 µL da solução de MTT a 2,5 mg/mL em PBS foram adicionados aos poços. Novamente, as placas foram incubadas por mais 4 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, os cristais de formazan formados pela redução do MTT nas mitocôndrias de células viáveis foram dissolvidos pela adição de 100 µL de SDS a 10% em HCl 0,01M, seguido por mais um período de incubação de 16 horas, nas mesmas condições anteriores. Células em DMEM 10% SFB sem tratamento foram utilizadas controle, correspondendo a 100% de viabilidade. Além disso, macrófagos incubados com peróxido de hidrogênio foram utilizados como controle de morte celular. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (Molecular Devices – Emax), no comprimento de onda de 570nm. As formulações não foram consideradas tóxicas quando a capacidade das células em metabolizar o MTT a formazan foi maior ou igual a 90% comparada ao controle (100% de viabilidade). Assim, a viabilidade celular foi estimada pela relação entre a absorbância das amostras testes em relação ao controle.

### **5.11 Produção de óxido nítrico por macrófagos**

A produção de óxido nítrico foi avaliada pela quantificação de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) no sobrenadante de cultura de células J774 após estímulo com LPS (Sigma-Aldrich, Brasil) e IFN-γ (Sigma-Aldrich, Brasil) pela reação com o reagente de Griess (GREEN et al., 1982; VERMA, N et al., 2010). Para a realização da dosagem de óxido nítrico, 1x10<sup>5</sup> células foram adicionadas a placas de 24 poços que foram incubadas por 2 horas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, todos os poços foram lavados com 200 µL de PBS estéril para remover as células que não aderiram e, em seguida, adicionados 200 µL de DMEM 10% SFB. Logo em seguida, as células foram estimuladas com IFN-γ (25 U/mL) e LPS (25 ng/mL) antes de serem incubadas com as diferentes concentrações das formulações lipossomais testadas. Para isso,

adicionou-se um volume de 200  $\mu\text{L}$  de DMEM 10% SFB contendo as diferentes concentrações de lipossomas, na presença ou ausência de soro fresco humano. A seguir, as placas com as culturas de células foram incubadas por 24 horas em estufa de  $\text{CO}_2$  a 5% e a  $37^\circ\text{C}$ .

Após a incubação, o sobrenadante das culturas de células foi coletado para a quantificação de NO pela reação com o reagente de Griess. Para a dosagem de NO, foram adicionados em placa de 96 poços, 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes celulares a cada poço e 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (mistura 1:1 de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 2,5% e diidrocloreto de N-[1-naftil]-etilenodiamino 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%). A seguir, foi feita uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, a absorbância do sobrenadante de cada poço foi determinada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 570 nm. Os dados de absorbância foram comparados com uma curva padrão obtida a partir de concentrações molares conhecidas (0-125  $\mu\text{M}$ ) de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em meio DMEM 10% SFB.

## **5.12 Análises estatísticas**

Realizaram-se as análises estatísticas com o auxílio do software GraphPad Prism 5. As amostras foram submetidas à análise de variância, usando o teste One-Way ANOVA seguida pelo teste de TUKEY. Também foi utilizado o Test T para as amostras que não seguiram um padrão de normalidade. Os resultados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p apresentou-se menor que 0,05.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Obtenção e caracterização dos lipossomas vazios

A caracterização dos lipossomas contendo DCP e DPPG foi realizada antes e após o processo de liofilização. Logo após o preparo, as formulações foram caracterizadas pela determinação de tamanho, IP e potencial zeta. Ambas as formulações apresentaram carga superficial negativa antes e após a liofilização, sendo que a formulação contendo o fosfolípido DCP apresentou carga de  $-71,28 \pm 2,841$  mV antes do processo de liofilização e de  $-15,86 \pm 0,520$  após a reidratação. Já a formulação constituída por DPPG apresentou potencial zeta de  $-46,73 \pm 2,466$  antes da liofilização e de  $-18,75 \pm 1,551$  após a formulação ser reidratada. Ao se analisar o tamanho de cada formulação lipossomal antes do processo de liofilização, verificou-se que as vesículas possuíam um tamanho médio de  $136,0 \pm 2,54$  e de  $137,2 \pm 2,715$ , para os lipossomas com DCP e DPPG, respectivamente. Além disso, ao serem analisados os IP das formulações, verificou-se que tanto a formulação contendo DCP, quanto a formulação constituída por DPPG apresentaram-se monodispersas antes do processo de liofilização, com valores de IP de  $0,123 \pm 0,027$  e  $0,059 \pm 0,006$  para lipossomas contendo DCP e DPPG respectivamente, menores que 0,3, valor que indica que as formulações são monodispersas (Tabela 4) (FREZÁRD, 2005; RIBEIRO et al., 2013).

**Tabela 4: Caracterização dos lipossomas antes da liofilização**

Lipossoma	Tamanho (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)
DCP	$136,0 \pm 2,542$	$0,123 \pm 0,027$	$-71,28 \pm 2,841$
DPPG	$137,2 \pm 2,761$	$0,059 \pm 0,006$	$-46,73 \pm 2,466$

**DCP:** Dicetilfosfato; **DPPG:** dipalmitoilfosfatidilglicerol; **IP:** índice de polidispersão

Após a liofilização, os lipossomas foram reidratados com água destilada e novamente caracterizados a fim de avaliar se as formulações apresentavam as mesmas características observadas antes do processo de liofilização (tabela 4). Porém, foi verificado um aumento do tamanho das vesículas contendo o fosfolípido

DCP, de  $150 \pm 1,856$  nm ( $p = 0,0013$ ) e redução do tamanho dos lipossomas de DPPG,  $119,1 \pm 1,531$  ( $p = 0,0006$ ). Apesar da variação de tamanho, as duas formulações lipossomais apresentaram-se monodispersas, com valores de IP menores que 0,3. Foi verificado também que cada formulação apresentou diferença significativa desse índice antes e após a liofilização, sendo que a formulação contendo o fosfolipídio DCP apresentou IP de  $0,039 \pm 0,016$  quando reidratada após o processo de liofilização ( $P= 0,0097$ ) e a formulação constituída por DPPG apresentou IP de  $0,148 \pm 0,020$  ( $P=0,0017$ ). SOUZA, (2013) também observou alteração de tamanho após a reidratação de lipossomas liofilizados com a mesma constituição que as formulações utilizadas neste estudo, ou seja, um aumento de tamanho para as formulações constituídas por DCP e diminuição do tamanho de lipossomas constituídos por DPPG.

**Tabela 5: Caracterização dos lipossomas após a reidratação**

<b>Lipossoma</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>IP</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
DCP	$150,5 \pm 1,856$	$0,039 \pm 0,016$	$-15,86 \pm 0,520$
DPPG	$119,1 \pm 1,531$	$0,148 \pm 0,020$	$- 18,75 \pm 1,551$

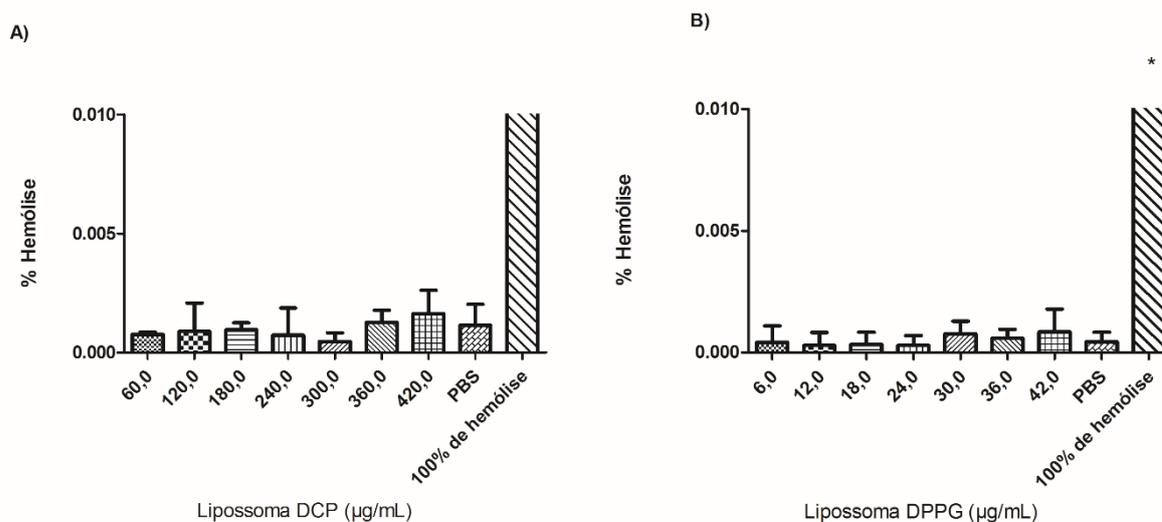
A proposta de uma nova formulação contendo o fosfolipídio DPPG foi feita na tentativa de reduzir os efeitos adversos descritos para lipossomas constituídos por DCP, assim como pelas características apresentadas por esse fosfolipídio, o qual é liberado para o uso em formulações administradas em humanos. Como o DCP, o DPPG possui carga negativa, podendo favorecer o encapsulamento do antimoníato de meglumina, fármaco que tem sido avaliado com lipossomas constituídos por DCP e que apresenta carga positiva (MESTRES et al., 1998; MANSOUR et al., 2001; SOUZA, 2013). Porém, como demonstrado anteriormente, a formulação com o novo fosfolipídio, quando reidratada, mostrou uma redução significativa de tamanho, o que poderia interferir na quantidade de fármaco que pode ser veiculado por ela e na interação com as células do SFM, uma vez que algumas interações, como a fagocitose, podem ser influenciadas pelo tamanho da vesícula lipossomal (SHARMA & SHARMA, 1997; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2007; BERTRAND & LEROUX, 2012).

## 6.2 Ensaio de atividade hemolítica

Os resultados obtidos no ensaio de atividade hemolítica demonstraram baixa taxa de hemólise após a incubação das formulações lipossomais com sangue total. O grau de hemólise foi comparado a uma amostra de sangue total incubada apenas com PBS, utilizada como controle negativo, já que o PBS não induz a lise das células por garantir isotonicidade do meio. O resultado de cada teste também foi comparado a amostras incubadas com água, a qual foi utilizada como indutora de hemólise.

A análise dos resultados do ensaio de atividade hemolítica demonstrou que todas as concentrações das duas formulações em estudo foram seguras com relação à interação com os glóbulos vermelhos (FIG.8 e 9). Os resultados demonstraram um grau de hemólise próximo ao observado com o sangue total incubado com PBS e abaixo de 2%, valor de hemólise máximo preconizado para testes *in vitro* segundo a ASTM - E2524-08, 2013 (KUZNETSOVA et al., 2012; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013).

**FIG. 8: Avaliação da atividade hemolítica de formulação lipossomas constituídos por DCP (A) e DPPG (B).** Diferentes concentrações da formulação lipossomal foram incubadas com sangue total por 1 hora a 37 °C. Em seguida, o sangue foi centrifugado e realizada a leitura da absorbância do sobrenadante das amostras a 570 nm em leitor de ELISA. O teste correspondente a 100% de hemólise foi realizado pela incubação de sangue total e água. As barras representam a média da taxa de hemólise  $\pm$  DP (n=6), (ANOVA, Tukey's test).



A fim de confirmar o grau de hemólise resultante da interação entre lipossomas e hemácias, a hemoglobina liberada foi dosada no sobrenadante das amostras de sangue total incubadas com as diferentes concentrações das formulações lipossomais. Assim, a pequena porcentagem de hemólise encontrada pôde ser confirmada pela baixa concentração de hemoglobina presente no sobrenadante, abaixo do limite de quantificação no método empregado. Nessa reação, a hemoglobina liberada, decorrente da lise dos glóbulos vermelhos, reage com o Reagente de Drabkin com conseqüente formação de cianometahemoglobina, que teve sua absorbância quantificada em leitor de ELISA a 570 nm. (DOBROVOLSKAIA et al, 2008; DASH, et al. 2010; TOMCZAK et al. 2010; KUZNETSOVA et al., 2012). Para determinar a sua concentração nas amostras após incubação com as formulações lipossomais, foi construída uma curva padrão com concentrações conhecidas de Hb, por regressão linear, a partir da equação da reta (tabela 6 e 7).

**Tabela 6: Concentração de hemoglobina no sobrenadante dos testes com lipossomas DCP.** A concentração de Hb foi determinada no sobrenadante de amostras de sangue total após a incubação com as diferentes concentrações lipossomais. Os resultados são apresentados como a média da concentração de Hb  $\pm$  DP (n=6). (ANOVA, Tukey's test).

<b>Lipossomas DCP (Concentração - <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Concentração de Hb – Média (g/dL) + Desvio Padrão</b>
PBS	1,525 $\pm$ 0,0003
60,0	1,525 $\pm$ 0,0003
120,0	1,525 $\pm$ 0,0005
180,0	1,525 $\pm$ 0,0003
240,0	1,525 $\pm$ 0,0008
300,0	1,525 $\pm$ 0,0004
360,0	1,525 $\pm$ 0,0005
420,0	1,524 $\pm$ 0,0006

**Tabela 7: Concentração de hemoglobina no sobrenadante dos testes com lipossomas DPPG.** A concentração de Hb foi determinada no sobrenadante de amostras de sangue total após a incubação com as diferentes concentrações lipossomais. Os resultados são apresentados como a média da concentração de Hb  $\pm$  DP (n=6). (ANOVA, Tukey's test).

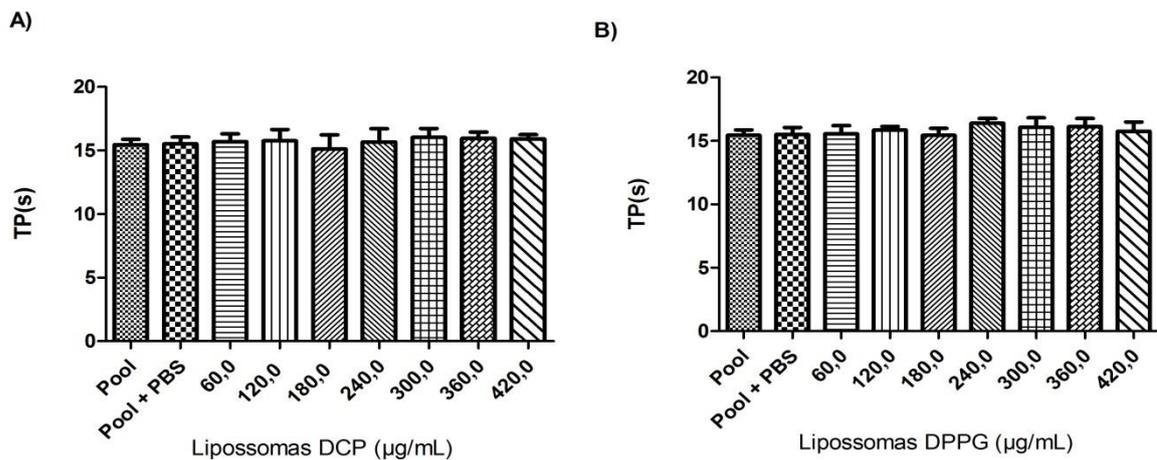
<b>Lipossomas DPPG (Concentração- <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Concentração de Hb – Média (g/dL)+ Desvio Padrão</b>
PBS	1,525 $\pm$ 0,0003
60,0	1,525 $\pm$ 0,0004
120,0	1,525 $\pm$ 0,0005
180,0	1,525 $\pm$ 0,0005
240,0	1,525 $\pm$ 0,0005
300,0	1,524 $\pm$ 0,0003
360,0	1,524 $\pm$ 0,0003
420,0	1,525 $\pm$ 0,0006

O baixo grau de hemólise encontrado deve-se provavelmente à repulsão entre vesículas lipossomais e as hemácias. Assim, tanto as hemácias quanto a formulação contendo DCP ou DPPG apresentam potencial zeta negativo, o que faz com que haja repulsão entre elas. Esses dados vão de acordo com os resultados do estudo de KUZNETSOVA et al., (2012), em que lipossomas com potencial zeta negativo não geraram índices de hemólise superiores à amostra controle (sangue total incubado com PBS), permanecendo, dessa forma, dentro dos limites aceitáveis estabelecidos para testes *in vitro* (E2524-08, 2013 - *Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles* – ASTM; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013).

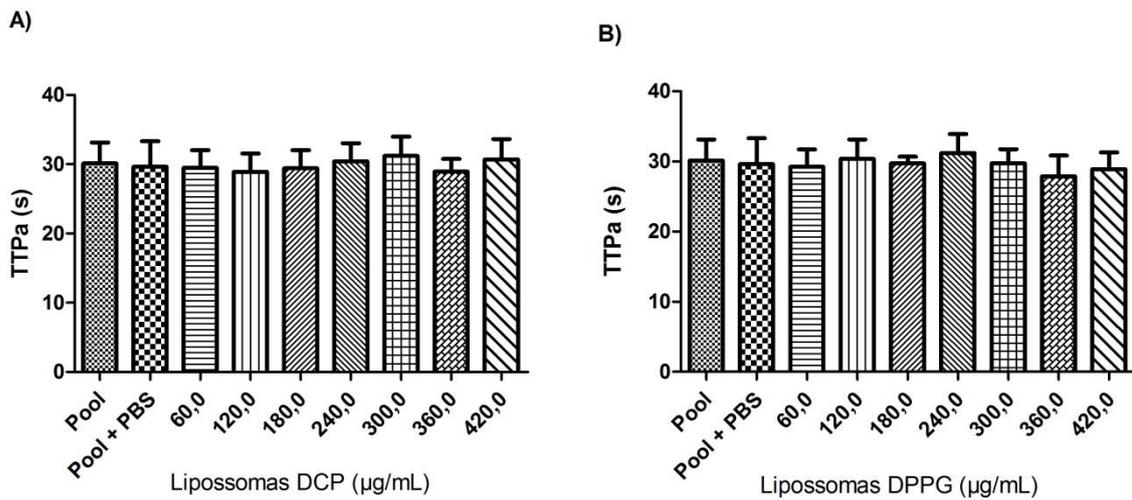
### 6.3 Avaliação do efeito das formulações lipossomais sobre a cascata da coagulação

A avaliação do efeito dos lipossomas sobre a cascata da coagulação demonstrou que nenhuma das concentrações das formulações testadas alterou o tempo de coagulação após incubação com um *pool* de plasmas humano. Assim, tanto o Tempo de Protrombina quanto o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada que avaliam, respectivamente, a via extrínseca e intrínseca da coagulação não foram alterados. Esse fato pôde ser observado pelos resultados obtidos quando o *pool* de plasmas foi incubado com as diferentes concentrações das formulações lipossomais comparado aos resultados obtidos nos testes realizados com o *pool* de plasma incubado com PBS.

**FIG.09: Tempo de Protrombina (TP): lipossomas DCP (A) e lipossomas DPPG (B):** a figura demonstra o tempo de coagulação de um *pool* de plasmas avaliado pela via extrínseca da coagulação das amostras após a incubação com as diferentes concentrações da formulação lipossomal contendo o fosfolípido DCP ou DPPG. Os dados representam a média do TP  $\pm$  DP (n=6). (ANOVA, Tukey's test).



**FIG.10: Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa): lipossomas DCP (A) e lipossomas DPPG (B).** A figura demonstra a avaliação da via intrínseca da coagulação pela determinação do TTPa após a incubação das diferentes concentrações de lipossomas constituídos por DCP ou DPPG com *pool* de plasmas humanos. Os dados representam a média do TTPa  $\pm$  DP (n=6). (ANOVA, Tukey's test).



A avaliação da cascata da coagulação adquire um grande valor, uma vez que os lipossomas administrados por via intravenosa podem interagir com componentes plasmáticos, como os fatores envolvidos na formação de coágulo. Assim, é relatado que proteínas envolvidas na cascata da coagulação, como o fibrinogênio, podem se adsorver à superfície desses carreadores e alterar o processo de coagulação (DOBROVOLSKAIA & McNEIL, 2007; DOBROVOLKAIA et al., 2008; KUZNETSOVA et al., 2012).

GALÁN, et al., (1998) mostraram que vesículas lipossomais constituídas por fosfolipídios presentes na membrana de plaquetas foram capazes de aumentar a deposição de fibrina, resultante da ativação da via comum da cascata da coagulação, em testes com fragmentos de aorta de coelhos que tiveram o tecido subendotelial exposto. Esses lipossomas eram compostos por fosfolipídios como fosfatidilcolina, fosfatidilinositol ou por uma mistura de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, assim como uma mistura de fosfatidilserina e fosfatidilcolina. Neste sentido, é importante ressaltar que as plaquetas, compostas por fosfolipídios carregados negativamente, fornecem uma área superficial importante, que provoca a ativação dos fatores envolvidos na formação de coágulo (FERREIRA et al., 2010; GALÁN et al., 2002). Da mesma forma, GALÁN et al., (2002) demonstraram que lipossomas constituídos pelo

fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) também foram capazes de provocar a ativação da cascata da coagulação. Neste estudo, foi possível perceber, assim como em seu trabalho anterior, um aumento da deposição de fibrina no subendotélio de fragmentos da aorta de coelhos, assim como o aumento dos fragmentos 1+2 de protombina no plasma desses animais.

Por outro lado, é importante observar que a formação de coágulo após a administração intravenosa de sistemas vetorizados como lipossomas apresenta um fator de risco à saúde. Neste sentido, é importante avaliar se tais formulações têm efeito sobre a cascata da coagulação, uma vez que a ativação desse processo pode levar a trombose ou a coagulação intravascular disseminada (DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013). Por outro lado, esse sistema de vetorização pode levar a uma deficiência no processo de formação do coágulo, alterando, por exemplo, a cascata da coagulação. Este fato pode ser exemplificado pela ligação de proteínas plasmáticas à superfície das vesículas, como fatores da cascata da coagulação e albumina, formando o que se conhece por “coroa de proteínas” (CEDERVALL et al., 2007; DOBROVOLKAIA et al., 2008; MONOPOLI et al., 2011; BENDER et al. 2012). Assim, KUZNETSOVA et al., (2012) mostraram que lipossomas constituídos por fosfatidilcolina e fosfatidilinositol carregados com metotrexato, que possuíam potencial zeta negativo, provocaram um prolongamento nos tempos de coagulação *in vitro*, detectados pela alteração nos testes de TTPa e TP.

#### **6.4 Efeito dos lipossomas sobre a contagem de plaquetas**

As duas formulações lipossomais, tanto a constituída pelo fosfolípido DCP, quanto a constituída por DPPG, não tiveram nenhum efeito sobre a contagem de plaquetas. O resultado obtido permite dizer que ambas as formulações não levaram à ativação da agregação plaquetária. Este fato é ilustrado nas figuras 14 e 15, onde é possível comparar o número de plaquetas após sua incubação com as diferentes concentrações lipossomais e com PBS, utilizado como controle negativo da agregação plaquetária, e com trombina, utilizada como controle positivo conhecida por induzir a ativação e agregação entre plaquetas.

As plaquetas possuem uma importante função no processo da coagulação sanguínea, uma vez que são importantes na formação de um tampão plaquetário nos

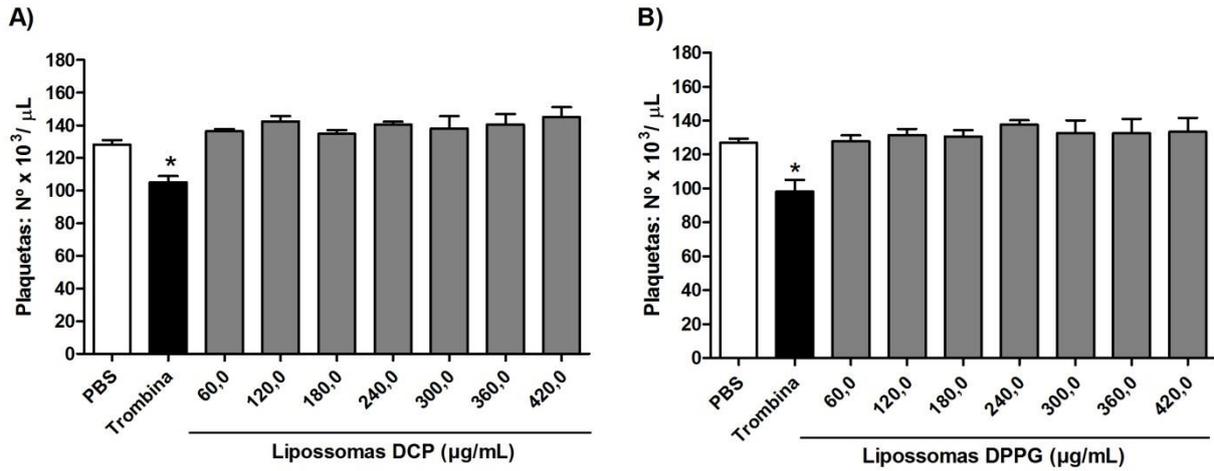
primeiros momentos após uma injúria vascular, e, para auxiliar, a partir da exposição de fosfolipídios carregados negativamente, a ativação dos fatores da cascata da coagulação e, assim, a formação e estabilização do coágulo de fibrina (BEVERS, COMFURIUS, ZWAALL, 1991; BOON, 1993; SIQUEIRA, 2001; CLEMETSON & CLEMETSON, 2001; ANDREWS, et al., 2003; FERREIRA et al., 2010). Dessa forma, a constituição das vesículas lipossomais e o potencial zeta representam importantes fatores na avaliação do processo da coagulação após a incubação de lipossomas com as amostras biológicas.

Neste sentido, os dados obtidos por KUZNETSOVA et al., (2012) demonstraram que nenhuma alteração foi observada sobre o número de plaquetas, em estudo *in vitro*, após a incubação de lipossomas carregados com metotrexato e de lipossomas carregados com melfalano, ambos de potencial zeta negativo, com plasma rico em plaquetas. Estes dados se assemelham com os resultados obtidos pelo presente estudo, em que as vesículas lipossomais testadas também possuem potencial zeta negativo e não induziram nenhuma alteração do número de plaquetas.

Os resultados encontrados neste trabalho diferem, porém, do estudo realizado por WASSEF et al., (1995), o qual utilizou lipossomas com carga negativa e também contendo o fosfolipídio DCP. Neste estudo, após administração intravenosa dos lipossomas em macacos (*Cynomologous monkeys*) observou-se uma redução do número de plaquetas e hemorragia disseminada. Porém, há relatos de uma baixa correlação de testes *in vitro* e *in vivo*, o que poderia justificar a diferença encontrada nos testes realizados no presente estudo dos dados obtidos no trabalho realizado por WASSEF et al., (1995). A baixa correlação está ligada ao envolvimento de uma complexa via bioquímica, envolvendo os fatores da cascata da coagulação e diferentes células, como plaquetas, leucócitos e células endoteliais. Além disso, outros ensaios são apontados para a avaliação do potencial trombogênico de sistemas nanoestruturados (DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013).

Assim, em termos de avaliação *in vitro*, tanto os resultados obtidos sobre o efeito dos lipossomas na ativação ou não de plaquetas, como também aqueles obtidos pelos testes que avaliam o efeito sobre a cascata da coagulação demonstram segurança das formulações. Pode-se perceber que tanto a hemostasia primária, representada pela atividade plaquetária, quanto a hemostasia secundária, representada pelos testes de TP e TPPa, não sofreram nenhuma alteração, mantendo-se dentro da faixa de normalidade.

**FIG. 11: Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DCP (A) e DPPG (B) sobre a contagem de plaquetas.** A figura demonstra o efeito de diferentes concentrações da formulação lipossomal vazia sobre uma suspensão de plaquetas. O PBS foi utilizado como controle negativo e a trombina, agente ativador da agregação plaquetária, foi utilizada como controle positivo. Os resultados são expressos como a média do número de plaquetas  $\pm$  DP (n=6). (ANOVA, Tukey's test), \* P<0,05.

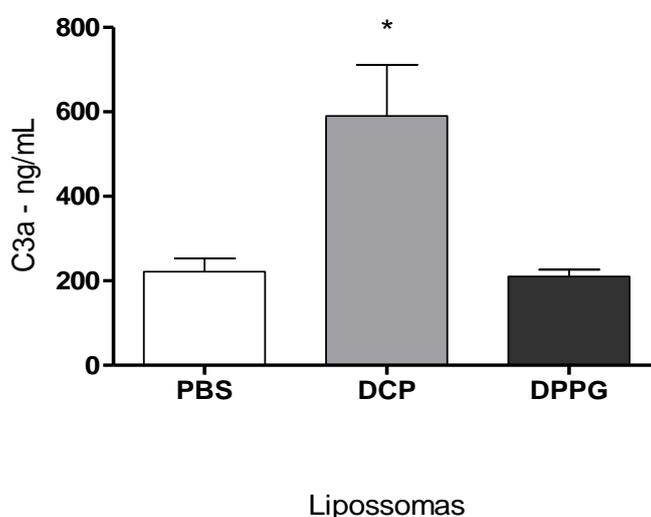


## 6.5 Efeito das formulações lipossomais sobre a ativação do sistema do complemento

### 6.5.1 Quantificação dos níveis séricos de C3a e do complexo SC5b-9

Após a incubação das formulações lipossomais na dose de 180 µg/mL, verificou-se que lipossomas constituídos pelo fosfolípido DCP foram capazes de ativar o sistema do complemento, observado pelo aumento de C3a dosado. De modo contrário, nenhuma alteração do nível de C3a após a incubação de soro com lipossomas constituídos por DPPG foi observada (Fig.16).

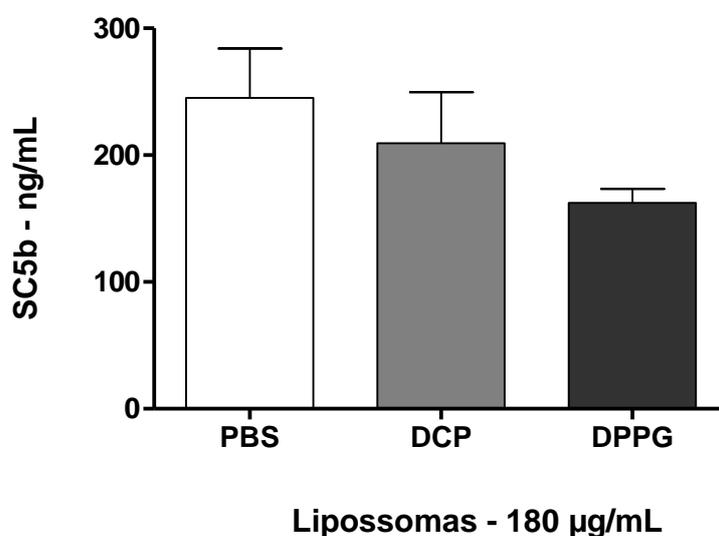
**FIG. 12: Efeito das formulações lipossomais constituídas por DCP ou DPPG sobre o sistema do complemento: quantificação dos níveis séricos de C3a.** Amostras de soro humano foram incubadas com as formulações lipossomais na concentração de 180 µg/mL por 30 minutos. Após este período, o nível de C3a presente no soro foi determinado por ELISA. Os resultados são expressos como a média do nível de C3a ± DP, (n=3), \*P< 0,05 (0,0031). (ANOVA, Tukey's test).



Ao se avaliar os níveis séricos do complexo SC5b-9, o qual permite avaliar a ativação do sistema do complemento até o final da cascata, verificou-se que nenhuma das formulações testadas, na dose de 180 µg/mL, alterou os níveis séricos desse complexo de proteínas em relação ao controle. Esses dados podem ser observados na figura 17 que faz a comparação dos níveis do complexo SC5b-9, obtidos das amostras de soro após a incubação com as duas formulações lipossomais e com

amostras de soro incubadas com PBS, usado como controle negativo da ativação do sistema do complemento.

**FIG. 13: Efeito das formulações lipossomais de DCP e DPPG sobre o sistema do complemento: quantificação dos níveis séricos do complexo SC5b-9.** Amostras de soro humano foram incubadas com as formulações lipossomais na concentração de 180 µg/mL por 30 minutos. Após este período, o nível do complexo SC5b-9 presente no soro foi determinado por Imunoensaio enzimático (ELISA). Os resultados são expressos como a média do nível de SC5b-9 ± DP, (n=3), (ANOVA, Tukey's test).



Como demonstrado pelo estudo, somente a formulação constituída por DCP foi capaz de ativar a formação do fragmento C3a, enquanto o nível do complexo SC5b-9 permaneceu inalterado para ambas as formulações. Assim, a ativação de C3a pode sugerir que os efeitos adversos observados por RIBEIRO et al, (2013) em cães, logo após a administração intravenosa de vesículas lipossomais constituídas por DCP, podem estar relacionados à ativação do sistema do complemento. Neste estudo, os autores sugeriram que efeitos como, taquipneia, prostração, micção, tremor muscular, vômito e defecação poderiam ser consequência da ativação do sistema do complemento pela reação conhecida Pseudoalergia Relacionada à Ativação do Complemento (CARPA). Tal reação difere da alergia clássica, a qual induz reações mediadas pela ligação de anticorpos IgE a mastócitos, com consequente liberação do conteúdo presente nos grânulos dos mastócitos, como a histamina, após a

sensibilização do organismo num contato prévio com o alérgeno (LARCHÉ; AKIS & VALENTA, 2006).

Dados obtidos no trabalho de WASSEF et al., (1995) indicam que o sistema complemento desempenha um importante papel na desestabilização de vesículas lipossomais após incubação com soro de macaco. Adicionalmente, SZEBENI, J. et al, (2011) destacam que um ampla variedade de lipossomas podem induzir CARPA, sendo que tanto a via clássica, como a alternativa e até mesmo a via da lectina podem ser ativadas por vesículas lipossomais.

É relacionado que a geração do fragmento C3a, assim como de outros fragmentos e também do complexo SC5b-9, desempenha um importante fator no desencadeamento das reações adversas relacionadas após a administração de lipossomas (CHANAN-KAN et al., 2003; SZEBENI, J. et al, 2011; KLAPPER, Y. et al., 2014). A liberação dos fatores acima mencionados leva à ativação de mastócitos e basófilos com liberação de mediadores alérgicos. Esses fatores desempenham diferentes ações em diferentes tecidos e órgãos, como vasoconstrição, disfunções cardiovasculares, extravasamento vascular e sintomas cutâneos por agirem em receptores H1. Também é descrito sinais como, vasodilatação, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial ao agirem em receptores H2 (SZEBENI, J. et al., 2011).

Como verificado nos gráficos apresentados, somente a formulação lipossomal contendo o fosfolipídio DCP levou a alterações significativas do nível do fragmento C3a. Porém, o nível do complexo terminal SC5b-9, dosado após a incubação com a formulação lipossomal constituída por DCP e também após a incubação com lipossomas constituídos por DPPG, não foi diferente do nível desse complexo quando amostras de soro foram incubadas com PBS. Resultado semelhante foi demonstrado por KUZNETSOVA et al., (2012), em que se observou um aumento na formação do fragmento C3a e nenhuma alteração dos níveis de SC5b-9 após a incubação de amostras de soro com lipossomas contendo pró-fármaco de metotrexato e lipossomas contendo o pró-fármaco de melfalano. Os autores sugeriram que a não alteração dos níveis de SC5b-9 observada no trabalho poderia ser resultado de um bloqueio da geração do complexo SC5b-9, de sua ligação aos lipossomas ao invés da ligação à proteína S, ou mesmo à decomposição do complexo sobre as condições estudadas.

Dessa forma, a formulação composta pelo fosfolipídio DPPG que foi proposta como alternativa para a formulação constituída por DCP apresentou-se mais segura em relação à ativação do sistema do complemento.

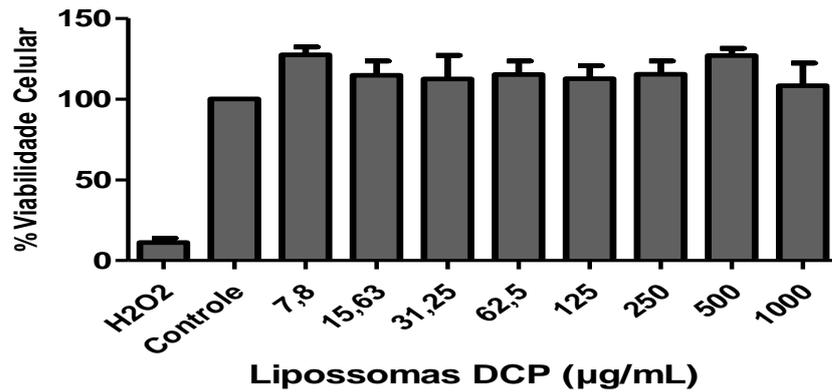
## 6.6 Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após o tratamento com as formulações lipossomais vazias

A próxima etapa foi avaliar o efeito das formulações lipossomais sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, células alvo da infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. Para isso, inicialmente foi avaliado o efeito das duas formulações sobre a viabilidade de macrófagos J774.A1. Posteriormente, avaliou-se o efeito das formulações sobre a produção de NO por macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$ .

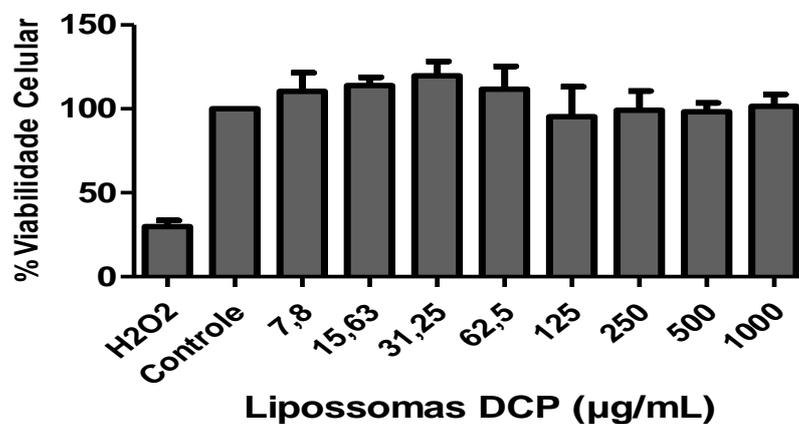
O ensaio de viabilidade celular foi realizado avaliando o efeito de diferentes concentrações das formulações lipossomais vazias sobre a população de macrófagos J774.A1 com doses lipossomais variando de 7,8 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . O objetivo desse ensaio foi encontrar uma faixa de concentração lipossomal que não fosse tóxica para a população de células em cultura. O teste foi realizado na presença e ausência de soro humano fresco, o qual é fonte de proteínas do complemento, de anticorpos e de outras proteínas que podem se ligar às vesículas lipossomais. As proteínas do soro podem então interferir na interação com os macrófagos, facilitando, por exemplo, o processo de fagocitose das formulações, o que poderia interferir na viabilidade dos macrófagos (LIU, D, 1997; BORGES, 2011; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013).

Os primeiros testes realizados com as diferentes concentrações propostas não evidenciaram nenhuma alteração na viabilidade celular quando os resultados foram comparados ao controle, que corresponde a 100% de viabilidade. Assim, observou-se que, em todas as concentrações testadas, tanto na presença, quanto na ausência de soro humano fresco, as células mantiveram-se com mais de 90% de viabilidade, valor a partir do qual considera-se ausência de toxicidade (VERMA et al., 2010) Esses resultados adquirem valor importante, uma vez que indicam boa segurança das formulações testadas em relação à viabilidade de macrófagos e contribuem, dessa forma, para que as formulações em estudo se tornem promissoras como sistema carreador de fármacos para o tratamento da leishmaniose.

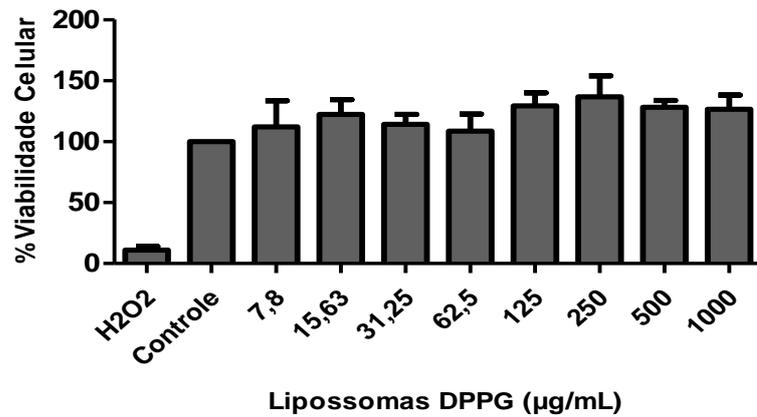
**FIG. 14: Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DCP sobre a viabilidade de macrófagos J774.A1.** Macrófagos J774.A1 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubados com diferentes concentrações de lipossomas constituídos pelo fosfolipídio DCP. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de citotoxicidade (MTT) e avaliada a viabilidade celular. Os dados foram comparados a uma amostra controle constituída por células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi utilizado como indutor de morte celular. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem da viabilidade celular  $\pm$  DP, (n=3), (ANOVA, Tukey's test).



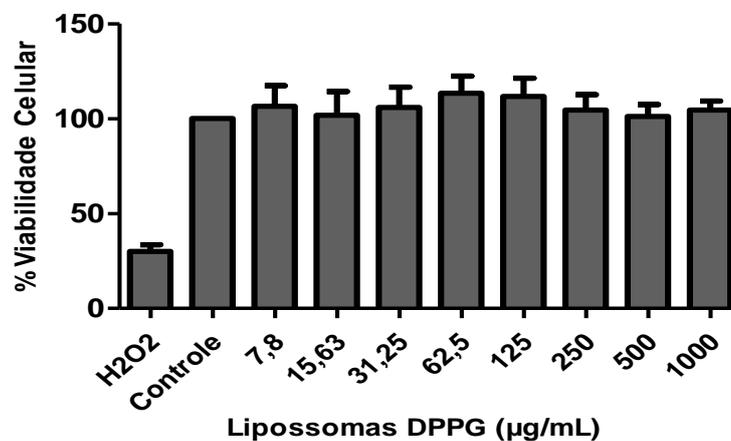
**FIG. 15: Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DCP na presença de soro humano fresco.** Macrófagos J774.A1 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubados com diferentes concentrações de lipossomas constituídos pelo fosfolipídio DCP e soro humano fresco. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de citotoxicidade (MTT) e avaliada a porcentagem de viabilidade celular. Os dados foram comparados a amostras controles, células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi utilizado como indutor de morte celular. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem da viabilidade celular  $\pm$  DP, (n=3), (ANOVA, Tukey's test).



**FIG. 16: Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DPPG sobre a viabilidade de macrófagos J774.A1.** Macrófagos J774.A1 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubados com diferentes concentrações de lipossomas constituídos pelo fosfolipídio DPPG. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de citotoxicidade (MTT) para avaliar a porcentagem de viabilidade celular. Os dados foram comparados a amostras controles, células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi utilizado como indutor de morte celular. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem da viabilidade celular  $\pm$  DP, (n=3), (ANOVA, Tukey's test).



**FIG. 17: Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DPPG na presença de soro humano fresco.** Macrófagos J774.A1 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubados com diferentes concentrações de lipossomas constituídos pelo fosfolipídio DPPG e soro humano fresco. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de citotoxicidade (MTT) e avaliada a porcentagem de viabilidade celular. Os dados foram comparados a amostras controles, células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi utilizado como indutor de morte celular. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem da viabilidade celular  $\pm$  DP, (n=3), (ANOVA, Tukey's test).

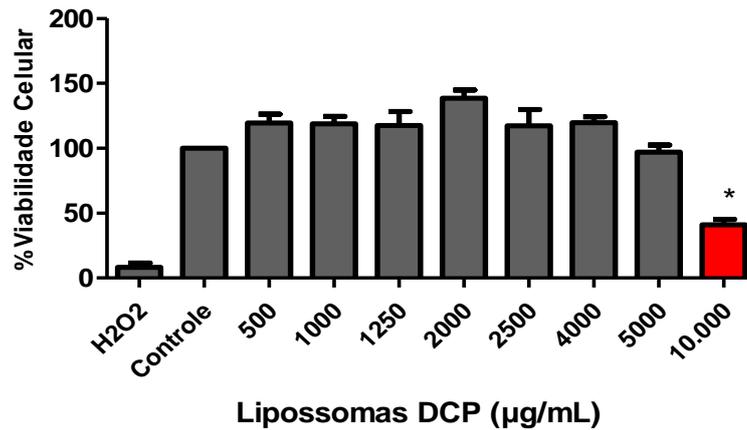


Dados da literatura mostram que o DCP pode ser tóxico para linhagens tumorais (CAMPBELL, 1983). Assim, decidiu-se avaliar a citotoxicidade das formulações lipossomais usando doses maiores das mesmas. O aumento das concentrações permite determinar uma faixa de segurança em que as formulações não são tóxicas para as células. Diante disso, novos testes de citotoxicidade foram realizados com as seguintes concentrações lipossomais: 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 1250 µg/mL, 2000 µg/mL, 2500 µg/mL, 4000 µg/mL, 5000 µg/mL e 10.000 µg/mL. Os estudos foram realizados nas mesmas condições anteriores, ou seja, na ausência e presença de soro humano fresco.

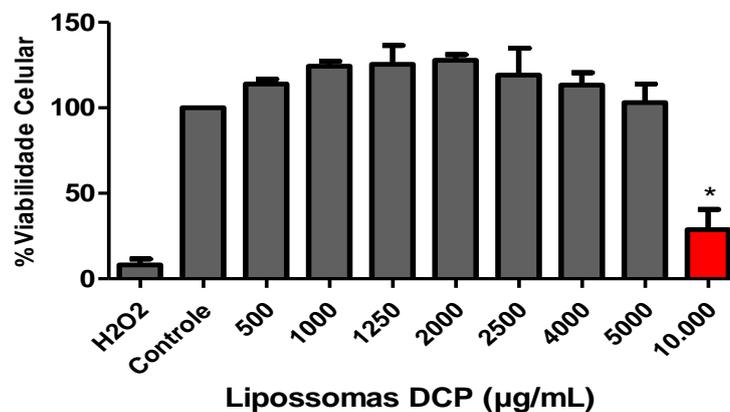
Os resultados dos novos testes demonstraram que apenas a formulação lipossomal constituída por DCP reduziu a viabilidade de macrófagos J774.A1. Esses resultados foram observados nos testes realizados tanto na ausência quanto na presença de soro humano. Porém, esses dados só foram observados na concentração mais alta testada, na dose de 10.000 µg/mL.

Ao contrário do que foi demonstrado para a formulação composta pelo fosfolípido DCP, lipossomas vazios constituídos por DPPG mostram-se altamente seguros. A formulação, mesmo na maior dose testada, não foi tóxica para a linhagem de macrófagos testada, mantendo índices de viabilidade celular superiores a 90% (GREEN et al., 1982; VERMA et al., 2010).

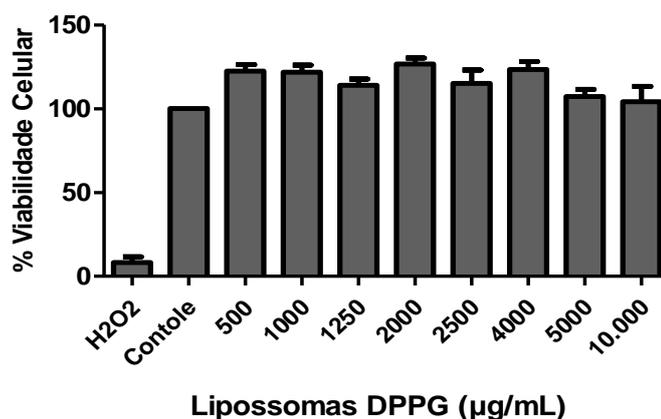
**FIG. 18: Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DCP sobre a viabilidade de macrófagos J774.A1 – (500 a 10.000 µg/mL).** Macrófagos J774.A1 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubados com diferentes concentrações de lipossomas constituídos pelo fosfolipídio DCP. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de citotoxicidade (MTT) e avaliada a porcentagem de viabilidade celular. Os dados foram comparados a amostras controles, células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi utilizado como indutor de morte celular. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem da viabilidade celular  $\pm$  DP, (n=3), (ANOVA, Tukey's test), \*  $P < 0,005$ .



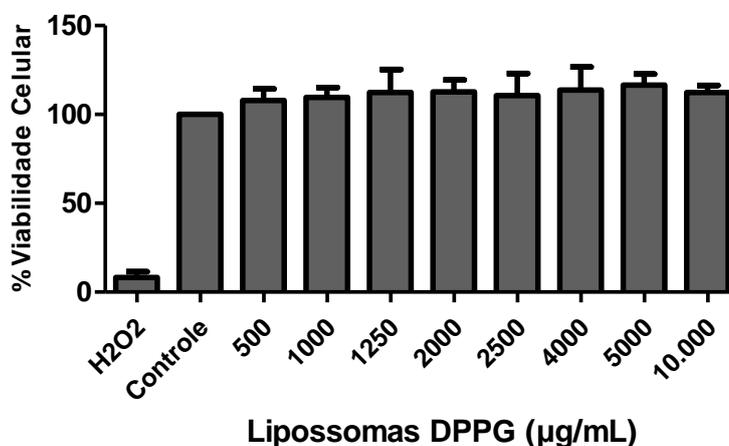
**FIG. 19: Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DCP na presença de soro humano fresco – (500 a 10.000 µg/mL).** Macrófagos J774.A1 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubados com diferentes concentrações de lipossomas constituídos pelo fosfolipídio DCP e soro humano fresco. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de citotoxicidade (MTT) e avaliada a porcentagem de viabilidade celular. Os dados foram comparados a amostras controles, células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi utilizado como indutor de morte celular. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem da viabilidade celular  $\pm$  DP, (n=3), (ANOVA, Tukey's test), \*  $P < 0,005$ .



**FIG. 20: Avaliação do efeito de lipossomas constituídos por DPPG sobre a viabilidade de macrófagos J774.A1 – (500 a 10.000 µg/mL).** Macrófagos J774.A1 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubados com diferentes concentrações de lipossomas constituídos pelo fosfolípido DPPG. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de citotoxicidade (MTT) e avaliada a porcentagem de viabilidade celular. Os dados foram comparados a amostras controles, células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. Os dados foram comparados a amostras controles, células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi utilizado como indutor de morte celular. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem da viabilidade celular  $\pm$  DP, (n=3), (ANOVA, Tukey's test).



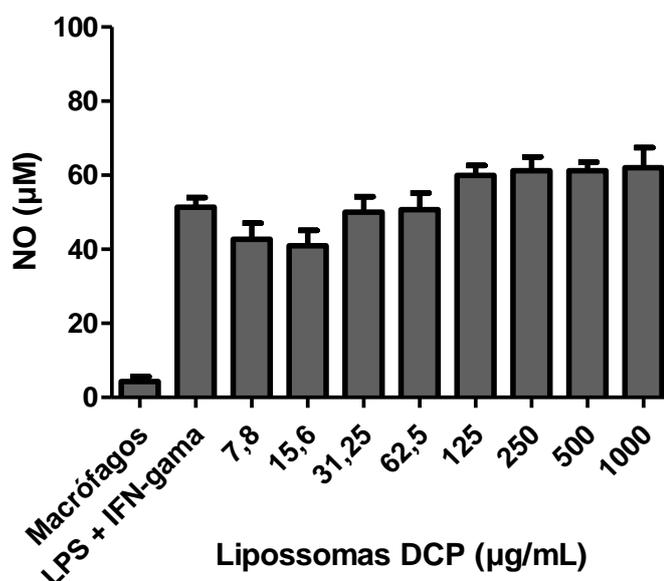
**FIG. 21: Avaliação da viabilidade de macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DPPG na presença de soro humano fresco – (500 a 10.000 µg/mL).** Macrófagos J774.A1 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram incubados com diferentes concentrações de lipossomas constituídos pelo fosfolípido DPPG e soro humano fresco. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de citotoxicidade (MTT) e avaliada a porcentagem de viabilidade celular. Os dados foram comparados a amostras controles, células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi utilizado como indutor de morte celular. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem da viabilidade celular  $\pm$  DP, (n=3), (ANOVA, Tukey's test).



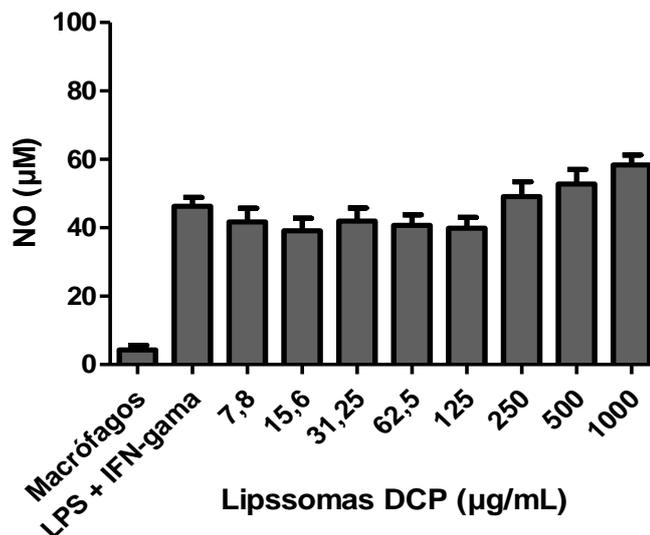
## 6.7 Produção de óxido nítrico por macrófagos com as formulações lipossomais vazias

A produção de NO por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e incubados com as diferentes concentrações lipossomais foi comparada com a produção de NO pelos macrófagos estimulados apenas com LPS e IFN- $\gamma$ . BANERJEE et al., (2011) demonstraram que lipossomas constituídos por fosfatidilcolina e estearilamina (com carga positiva) são capazes de ativar a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS pela a inibição de citocinas anti-inflamatória, como TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10. Já os resultados obtidos por este trabalho não demonstraram nenhuma alteração do nível deste composto após o tratamento com as formulações testadas. Esses resultados foram observados para os testes realizados na ausência e na presença de soro humano fresco.

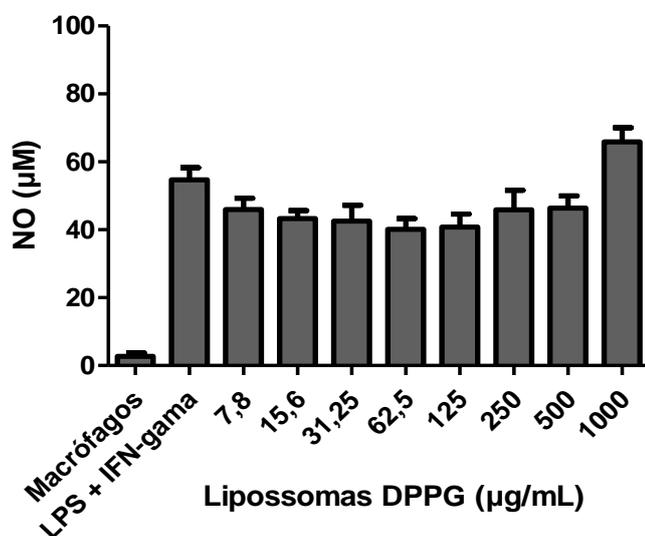
**FIG. 22: Efeito de lipossomas constituídos por DCP sobre a produção de óxido nítrico após a incubação com macrófagos J774.A1.** O teste foi realizado comparando a produção de óxido nítrico produzido por macrófagos não estimulados, macrófagos J774.A1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e macrófagos estimulados e incubados com diferentes concentrações da formulação lipossomal vazia por 24 horas. Após o período de incubação, a produção de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante de cultura de células através do doseamento de nitrito de sódio. Os resultados foram apresentados como média de NO  $\pm$  DP. (ANOVA, Tukey's test).



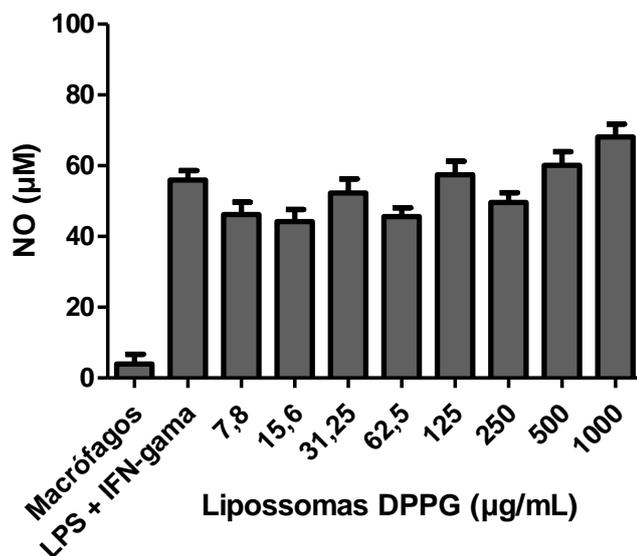
**FIG. 23: Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DCP na presença de soro humano fresco:** O teste foi realizado comparando a produção de óxido nítrico produzido por macrófagos não estimulados, macrófagos J774.A1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e macrófagos estimulados e incubados com diferentes concentrações da formulação lipossomal vazia por 24 horas. Após o período de incubação, a produção de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante de cultura de células através do doseamento de nitrito de sódio. Os resultados foram apresentados como média de NO  $\pm$  DP. (ANOVA, Tukey's test).



**FIG. 24: Efeito de lipossomas constituídos por DPPG sobre a produção de óxido nítrico após a incubação com macrófagos J774.A1.** O teste foi realizado comparando a produção de óxido nítrico produzido por macrófagos não estimulados, macrófagos J774.A1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e macrófagos estimulados e incubados com diferentes concentrações da formulação lipossomal vazia por 24 horas. Após o período de incubação, a produção de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante de cultura de células através do doseamento de nitrito de sódio. Os resultados foram apresentados como média de NO  $\pm$  DP. (ANOVA, Tukey's test).



**FIG. 25: Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos J774.A1 após a incubação com lipossomas constituídos por DPPG na presença de soro humano fresco.** O teste foi realizado comparando a produção de óxido nítrico produzido por macrófagos não estimulados, macrófagos J774.A1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e macrófagos estimulados e incubados com diferentes concentrações da formulação lipossomal vazia por 24 horas. Após o período de incubação, a produção de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante de cultura de células através do doseamento de nitrito de sódio. Os resultados foram apresentados como média de NO  $\pm$  DP. (ANOVA, Tukey's test).



O óxido nítrico é um radical livre gasoso sintetizado a partir da L-arginina e do oxigênio molecular pela enzima óxido nítrico sintase (MONCADA, PALMER & HIGGS, 1991, CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002). Esse gás é produzido por uma variedade de células, dentre elas macrófagos ativados, e possui um tempo de vida muito curto, sendo determinado, *in vitro*, pelo acúmulo de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no sobrenadante de células em cultura (MONCADA, PALMER & HIGGS, 1991, VERMA et al, 2010). O óxido nítrico possui várias funções, incluindo ações imunológicas, induzindo, por exemplo, citotoxicidade mediada por macrófagos, além de mediar respostas inflamatórias. Assim, é visto que a produção de óxido nítrico por macrófagos é um importante fator na resposta imunológica em resposta a infecção por protozoários do gênero *Leishmania* (BANERJEE et al., 2011). Ações vasculares como a vasodilatação, regulação da pressão sanguínea e inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária também são descritas (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002, AKTAN, 2004).

Lipossomas carregados negativamente compostos por ácido fosfatídico e lipossomas constituídos por fosfatidilserina demonstraram efeito inibitório na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados por LPS.

Esse achado foi relacionado à inibição da produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), confirmado pela técnica de imuno blotting, demonstrando a ausência da banda correspondente ao peso molecular dessa enzima (ARAMAKI et al, 1996). Outro estudo apontou que a inibição da produção de óxido nítrico por lipossomas contendo fosfatidilserina, detectada pela inibição do RNAm para iNOS, assim como da produção da enzima, poderia ser relacionado a níveis aumentados de TGF- $\beta$  encontrados no estudo (MATSUNO, ARAMAKI & T SUCHIYA, 2001). Foi sugerido também que lipossomas aniônicos constituídos por fosfatidilserina inibem a produção de NO através da ativação da via de sinalização envolvendo a Kinase Regulada por sinal Extracelular (ERK), que faz parte da família da MAP Kinases, ativando assim a produção de TGF- $\beta$  por macrófagos peritoneais de camundongos. Esses achados foram observados pelo aumento da produção de TGF- $\beta$ , detectado pela técnica de ELISA e também por uma maior expressão do RNAm dessa citocina, que foi quantificado pela técnica de PCR em Tempo Real (RT-PCR). Além disso, foi visto pela técnica de Western blotting que o nível da proteína ERK foi notavelmente superior após o tratamento dos macrófagos com os lipossomas (OTSUKA, TSUCHIYA & ARAMAKI, 2004).

A citocina TGF- $\beta$  é conhecida por ativar a produção de arginase 1, a qual cliva a L-arginina, depletando seu conteúdo nos macrófagos e, assim, impedindo a produção de NO. Além dessa ação, o TGF- $\beta$  também age inibindo a expressão de enzima óxido nítrico sintase 2 (induzível), a qual converte, na presença do oxigênio, a L-arginina em L-citrulina e NO (BOGDAN, 2015). Dessa forma, o TGF- $\beta$  é uma citocina importante na imunomodulação da produção de óxido nítrico, o qual é essencial na resposta imune frente à infecção por parasitos do gênero *Leishmania* (BANERJEE, DE & ALI, 2011).

Em adição aos achados descritos acima, fosfolipídios aniônicos, como palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) e fosfatidilinositol (PI) foram capazes de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  em células U937 e de NO por macrófagos alveolares de ratos após o estímulo com LPS. A ação de POPG foi atribuída a não ativação das proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinais que culminam com a transcrição dos genes responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios. Também foi demonstrado que o fosfolipídio POPG quanto o fosfolipídio PI ligam-se ao receptor CD14, presente na membrana de macrófagos, o qual é ligante para o LPS,

e, inibindo por competição, a ligação do LPS a esse receptor (KURONUMA et al, 2009).

Por outro lado, no mesmo estudo realizado por KURONUMA et al, (2009) foi demonstrado que o fosfolipídio DPPG não inibiu as vias de sinalização e conseqüentemente a produção de NO após o estímulo de macrófagos com LPS. Da mesma forma, no presente estudo, a produção de NO por macrófagos J774.A1 após estímulo com LPS e IFN- $\gamma$  e incubação com as formulações lipossomais com potencial zeta negativo, não diferiu dos níveis de NO produzidos quando apenas macrófagos foram estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ .

Conclui-se então, que as formulações lipossomais nas doses testadas não afetam a produção de NO, mantendo seu nível semelhante ao nível encontrado no sobrenadante de macrófagos estimulados por LPS e IFN- $\gamma$ . Dessa forma, as formulações não têm efeito sobre a produção desse gás por macrófagos J774.A1.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos testes de caracterização realizados, pode-se observar que após a reidratação, as vesículas lipossomais sofreram alteração de tamanho. Verificou-se que vesículas compostas pelo fosfolípido DCP tiveram seu tamanho aumentado, enquanto no caso de lipossomas constituídos por DPPG observou-se redução do tamanho após a reidratação. Embora as formulações tenham sofrido alterações de tamanho, esse fato parece não ter influenciado seu comportamento nos testes realizados *in vitro*, sendo que nenhuma alteração foi encontrada para lipossomas constituídos por DPPG. Já as alterações encontradas em testes realizados com a formulação constituída por DCP foram relacionadas à presença desse fosfolípido.

Quanto à interação das duas formulações com componentes sanguíneos, como as hemácias, nota-se que as formulações provocaram baixa taxa de hemólise, mantendo os valores de atividade hemolítica bem abaixo dos valores estipulados para testes *in vitro*. A baixa atividade hemolítica pôde ser confirmada pela concentração de Hb dosada, em que não se detectou nenhuma alteração entre os testes e as amostras controles.

Ao analisar o processo de coagulação, verificou-se também, que nenhuma alteração foi vista após incubação das formulações lipossomais com *pool* de plasma. Os tempos de coagulação determinados pela via intrínseca e extrínseca da coagulação avaliados pelos testes de TTPa e TP, respectivamente, mantiveram-se dentro da faixa de normalidade e não se diferiram dos testes realizados quando o *pool* de plasma foi incubado com PBS. Dessa forma, pode-se concluir que os lipossomas constituídos por DCP e os lipossomas constituídos por DPPG não interferem nas vias acima mencionadas, não interferindo na cascata da coagulação.

Percebeu-se também que ambas as formulações não alteraram a contagem de plaquetas após sua incubação com uma solução rica em plaquetas. Esse achado pode sugerir que as formulações não interferem no processo da ativação e agregação plaquetária, mantendo-se o número de plaquetas inalterado, as quais possuem papel fundamental na hemostasia primária.

Porém, ao avaliar a ação das formulações lipossomais em estudo sobre o sistema do complemento, verificamos que lipossomas constituídos por DCP foram capazes de ativar esse sistema pelo aumento da produção do fragmento C3a. Esse resultado sugere que os sinais e sintomas observados em cães após a administração

de tais formulações no estudo realizado por RIBEIRO et al, (2013) estão associados à ativação do complemento, em uma reação conhecida por Pseudo Alergia Relacionada a Ativação do Complemento. Já as formulações lipossomais constituídas por DPPG não alteraram nenhum dos parâmetros avaliados em relação ao complemento, indicando sua segurança *in vitro* quanto a sua interação com esse sistema.

Em relação à viabilidade de macrófagos, observou-se que as formulações são seguras, conferindo taxas de viabilidade celular maiores que 90%. Porém, a formulação contendo o fosfolípido DCP apresentou toxicidade somente quando testada em uma dose muito elevada, 10.000 µg/mL, tanto na presença quanto na ausência de soro humano fresco. Já a formulação constituída por DPPG não alterou a taxa de viabilidade em nenhuma das concentrações testadas na presença ou ausência de soro humano fresco.

Quanto à ativação de macrófagos, avaliada pela produção de óxido nítrico, as formulações lipossomais não interferiram na sua produção após a incubação com macrófagos estimulados por LPS e IFN- $\gamma$  quando comparado a macrófagos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ . Esse resultado foi verificado quando as formulações foram incubadas na presença de soro humano fresco quanto na sua ausência.

Assim, diante dos resultados encontrados, verificou-se que a formulação lipossomal constituída por DPPG mostrou-se mais segura em relação à formulação constituída por DCP. Nota-se que as vesículas lipossomais constituídas por DPPG, não alteraram nenhum dos testes realizados nos estudos *in vitro*, tornando esse fosfolípido promissor para substituição do fosfolípido DCP, o qual foi capaz de ativar o sistema do complemento. Dessa forma, a fim de melhor avaliar a segurança da formulação proposta e também sua eficácia no tratamento da leishmaniose, testes *in vitro*, com o fármaco encapsulado, antimoniato de meglumina, devem ser realizados. Além dos testes *in vitro*, a avaliação *in vivo*, se faz necessária, a fim de verificar o comportamento desse sistema de vetorização após a sua administração no organismo.

## 8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados neste, verificou-se que a formulação lipossomal constituída pelo fosfolipídio DPPG mostrou-se mais segura em relação à formulação constituída por DCP. Nota-se que as vesículas lipossomais constituídas por DPPG, não alteraram nenhum dos testes realizados nos estudos *in vitro*, tornando esse fosfolipídio promissor para substituição do fosfolipídio DCP, o qual foi capaz de ativar o sistema do complemento, o que pode levar a um quadro de hipersensibilidade, considerado assim um fator de risco à vida. Dessa forma, testes futuros, a fim de melhor avaliar a segurança da formulação proposta e também sua eficácia no tratamento da leishmaniose como, testes *in vitro* com o fármaco encapsulado, antimoniato de meglumina, devem ser realizados. Além disso, a avaliação *in vivo*, se faz necessária, a fim de verificar o comportamento desse sistema de vetorização após a sua administração no organismo.

## 9 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 560 p.

ADLER-MOORE & PROFFITT. Effect of tissue penetration on ambisome efficacy. **Current Opin Investig Drugs**, v.4, n.2, 2003.

AKBARZADEH et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Res Lett**, v.8, n. 102, 2013.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci**. v 75, n. 6, p 639-53, 2004.

ALLEN, T. M. & CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Adv Drug Deliv Rev**, 65, p.36-48, 2012.

ALMEIDA, L. P. et al. O laboratório clínico na investigação dos distúrbios da hemoglobina. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n.3, p. 271-278, Jun 2011.

ALVIN, C.R. Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. **Parasitol Today**, v.2, n.4, 1986.

ANDREWS, R. K., et al., Molecules in focus: glycoprotein Ib-IX-V. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, v 35, p. 1170-1174, 2003.

ANDREWS, R, K.; LÓPEZ, J. A.; BERNDT, M. C. Review: molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. **Int. J. Biochem Cell Biol**, v. 29, n. 1, p. 91-105, 1997.

ARAMAKI et al. Inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production from macrophages stimulated by LPS. **Biochemical and biophysical research communication**, v. 220, n. 0346, p. 1-6, 1996.

BACELLAR, O. & CARVALHO, E.M. Immunopathogenesis of visceral leishmaniasis. **Gaz Méd Bahia**, v. 75, n., p.24-34, 2005.

BALASEGARAM, M. et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion**, p. 493-510, 2012.

BANCO DE SANGUE VETERINÁRIO. **Grupo Polivet**. Itapetininga, São Paulo. Disponível em: < <http://www.polivet-itapetininga.vet.br/bsv/>>. Acesso em: 13 abr. 2014.

BANERJEE, A., DE, M., ALI, N. Combination therapy with armomycin-associated stearylamine-bearing liposomes cures experimental Visceral Leishmaniasis through Th1-biased immunomodulation. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p. 1661–1670, 2011.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. D.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Rev Bras Ciênc Farm**, Brasil. 43, 2007.

BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **Int J Pharm**, v. 426, n. 1-2, p. 271-9, Apr 2012.

BERTRAND, N.; LEROUX, J.C.. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective. **J Control Release**, v. 161, p. 152-163. 2012.

BEVERS, E. M.; CORNFURIUS, P.; ZWAAL R. F. A. Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. **Blood Rev**; v. 5, p. 146-54, 1991.

BD BIOSCIENCES. **Technical Data Sheet: Mouse IL-10 ELISA Set**. Disponível em: <[www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)>. Acesso em: 20 jun. 2014.

BD BIOSCIENCES. **Technical Data Sheet: Mouse TNF(Mono/Mono) ELISA Set**. Disponível em: <[www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)>. Acesso em: 20 jun. 2014.

BHATTACHARJEE, S. et al. Anti-IL-10 mAb protection against experimental Visceral Leishmaniasis via induction of Th1 cytokines and nitric oxide. **Indian J. Exp. Biol**, v. 47, p. 489–497, 2009.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends Immunol**. v. 36, n. 3, p. 161-178, 2015.

BOON, G. D. An overview of hemostasis. **Toxicologic Pathology**, v. 21, n. 2, 1993.

BORGES, J. R. **Avaliação da atividade de nanocápsulas com diferentes características superficiais sobre a resposta imune de células J774.A1 e sobre a infecção por *Leishmania infantum***. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Ouro Preto, 2011.

BORN, G. V. R. & CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **J. Physiol**. v. 168, p. 178-195, 1963.

BORN, G. V. R. & CROSS, M. J. Effects of inorganic ions and of plasma proteins on the aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. **J. Physiol**. v. 170, p. 397-414, 1964.

CAMPBELL, P.I. Toxicity of some charged lipids used in liposomes preparations. **Cytobios**. v.37, p. 21-26, 1983.

CARVALHO, W. F. Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia. Cap.6. **O sangue: considerações gerais**. 8ª ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2008.

CARVALHO, William de Freitas. Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia. **Fragilidade osmótica das hemácias**. Cap. 25. 8º ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2008. 281p.

CAPELARI-OLIVEIRA et al. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteracea (Brazilian "Arnica"). **J Ethnopharmacol**. v. 135, p 393-398, 2011.

CEDERVALL, T. et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proc Natl Acad Sci**. v. 104, n. 7. p. 2050-2055, 2007.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir Bras**. v. 17, n. 6, nov-dez 2002.

CHANAN-KHAN, A et al. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. **Ann. Oncol**. 14, p.1430-1437, 2003.

CHANG. HSIN-I; YEH, MING-KUNG. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **Int. J. Nanomedicine**. 7, p. 49-60, 2012.

CLEMETSON, K. J, CLEMETSON, J, M. Platelet collagen receptors. **Thromb Haemost**, v. 86, p. 189–97, 2001.

CONTI, P. et al., IL-10 an inflammatory inhibitory cytokine, but not always. **Immunol Lett**, v.86, p. 123-129. 2003.

DAHBACK, B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: Genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. **J Intern Med**, v.257, p. 209-223, 2005.

DASH, B.C. et al. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. **Biomaterials**, v.31, p. 8188-8197, 2010.

DAVIE, E. W., & RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticles biodistribution. **Mol Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 487-495, 2008.

DOBROVOLSKAIA, M. A. & MCNEIL, S.E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature**, v. 2, Ago. 2007.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNeil, S. E. Understand the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity test for nanomedicines. **J Control Release**, v.172, p.456-466, 2013.

DOBROVOLSKAIA, M. A. & NEUN, B. W. **Analysis of hemolytic properties of nanoparticles**. NCL method ITA-1. Nanotechnology Characterization Laboratory, Nov. 2009.

DOBROVOLSKAIA, M. A. & NEUN, B. W. **Analysis of platelet aggregation**. NCL method ITA-2. Nanotechnology Characterization Laboratory, Dec. 2009.

DOBROVOLSKAIA, M. A. & NEUN, B. W. **Coagulation assays**. NCL method ITA-12. Nanotechnology Characterization Laboratory, Set. 2011.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; NEUN, B.W. **Qualitative analysis of complement activation**. NCL Method ITA5-2. 2010.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; POTTER, T.M. **Mouse granulocyte-macrophage colony-forming unit assay**. NCL Method ITA-3. 2009.

E2425, Standard test method for analysis of hemolytic properties of nanoparticles. **ASTM**, 2008.

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for industry. **Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers**. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Jul. 2005.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas aplicações. **Rev Bras Hemat Hemoter**, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FERREIRA, F. M. et al. Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, v. 113, n.2, p. 533-543, 2013.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Simpósio: Hemostasia e Trombose**. Medicina, v. 34, p. 229-237, Ribeirão Preto/ São Paulo, Jul./Dez. 2001.

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

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova**, v. 15, n. 00, 2005

FRÉZARD, F. et al. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. **Braz J Med Biol Res**, 33: 841-846, 2000.

FROHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, 7, p. 5577-5591, 2012.

GALÁN, A. M. et al. Possible hemostatic effect of synthetic liposomes in experimental studies under flow conditions. **Haematologica**, v. 87, n. 6, p. 615-623, Jun 2002.

GALÁN, A. M. et al. Preparations of synthetic phospholipids promote procoagulant activity on damage vessels: studies under flow conditions. **Haematologica**, v.38, Nov./Dez. 1998.

GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**. 126:131, 1982.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11<sup>a</sup> ed, Elsevier, 2006.

HOGMAN, C.F.; HEDLUND, K.; SAHLESTROM, Y. Red-cell preservation in protein poor media. Protection against in vitro hemolysis. **Vox Sang**. 41, p. 201-209, 1981

INVITRO DIAGNÓSTICA LTDA. **Hemostat aPTT-EL**. Itabira/MG, 07/2013.

INVITRO DIAGNÓSTICA LTDA. **Hemostaat Thromboplastin-SI**. Itabira/MG, 07/2013.

ISHIDA et al. Enhancing effect of cholesterol on the elimination of liposomes from circulation is mediated by complement activation. **Int J Pharm**, 156, p. 27-37, 1997.

JUNG, M, S.; MOROI, M. Activation of the platelet collagen receptor integrin  $\alpha_2\beta_1$ : its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. **Trends Cardiovasc Med**, v. 10, p. 285-292, 2001.

KATSNELSON, B.A. et al. Subchronic systemic toxicity and bioaccumulation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nano- and microparticles following repeated intraperitoneal administration to rats. **Int J Toxicol**, v. 30, n. 1, p. 59-69, 2011.

KIM et al. Preparation and characteristics of multilayer lamellar vesicle using phosphate ester surfactant. **J of Korean Oil Chemists Soc**, v 30, n.2, p.280-289, 2013.

KLAPPER, Y. et al. Mediation of a non-proteolytic activation of complement component C3 by phospholipid vesicles. **Biomaterials**, v. 35, n. 11, p 3688-3696, 2014.

KORHONEN, R. et al., Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, p. 471-49, 2005.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. Robbins e Cotran. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7ª ed. Elsevier. 2005. 1616p.

KUMAR, R. & NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 3, p. 1-10, Aug. 2012.

KURONUMA, K. et al. Anionic pulmonar surfactante phospholipids inhibit inflammatory responses from alveolar macrophages and U937 cells by binding the lipopolysaccharide-interacting proteins CD14 and MD-2. **J Biol Chem**, v. 284, n. 38, p. 25488-25500, 2009.

KUZNETSOVA, N. R. et al. Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer. **J Control Release**, v. 160, n. 2, p. 394-400, Jun 2012.

LABTEST DIAGNÓSTICA SA. **Padrão de Hemoglobina**. Ref. 47. Lot.4001, MS 10009010028, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.

LANDESMAN-MILO, D.; PEER, D. Altering the immune response with lipid-based nanoparticles. **J Control Release**, v. 161, n. 2, p. 600-8, Jul 2012.

LANKOFF, A. et al. The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP1 cells. **Toxicol Lett**, v. 208, n3, p. 197-213, 2012.

LEITE, E. A. et al. Acute toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin in mice after intraperitoneal administration. **Life Sci**, v. 84, n. 19-20, p. 641-9, May 2009.

LICHTMAN, M. A. et. al. Williams; hematology. 7ª ed. McGraw-Hill Companies, 2006. 2297 p, v.487.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U. & BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**. V.213, p. 377-387, 2008.

LIMA, E. B. et al. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An Bras Dermatol.**, v. 82, n. 2, p. 111-24, 2007.

LIU, D. Biological factors involved in blood clearance of liposomes by liver. **Adv Drug Deliv Rev**, 24, p.201-213, 1997.

LORENZI, T.F. **Manual de Hematologia**: propedêutica e clínica. 4ªed, Guanabara Koogan, 2006. 722 p.

LOWENBERG, E. C.; MEIJERS, J. C. M.; LEVI, M. Platelet-vessel wall interaction in health disease. **Neth J Med**, v. 68, n. 6, Jun. 2010.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**, v.202, p498-499, 1964.

MANSOUR, H. et al. Comparison of Bilayer and Monolayer Properties of Phospholipid Systems Containing Dipalmitoylphosphatidylglycerol and Dipalmitoylphosphatidylinositol. **Langmuir**, 17, 6622-32, 2001.

MATSUNO, R.; ARAMAKI, Y.; TSUCHYA, S. Involvement of TGF-beta in inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production by macrophages stimulated with lps. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 281, p. 614-620, 2001.

MAYER, B.& HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem Sci**, 22, p. 477-481, 1997.

MCPHEE, S.J & GANONG, W.F. **Fisiopatologia da doença**: uma introdução a medicina clínica. 5ª ed, McGraw Hill Brasil, 2007, 784p.

MERTINS, O. **Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana**. 2004. 78 f. (Mestrado). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MESTRES, C. et al. Interaction of colistin with lipids in liposomes and monolayers. **Int J pharm**, v.160, p. 99-107, 1998.

MODERY-PAWLOWSKI, C. L. et al. In vitro and in vivo hemostatic capabilities of a functionally integrated platelet-mimetic liposomal nonoconstruct. **Biomaterials**, 34, p. 3031-3041, 2013.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J. & HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, 1991.

MONOPOLI, M.P. et al., Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. **J Am Chem Soc**, v. 133, p. 2525-2534, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

MP Biomedicals. Disponível em: <<http://www.mpbio.com/product.php?pid=05215152&country=30>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 29, n.2, p. 168-178, 2007.

MULLER-EBERHARD, H.J. The membrane attack complex. **Springer Semin. Immunopathol**, 7, p.93-141, 1984.

NEUN, B.W. e DOBROVOLSKAIA, M.A. Qualitative analysis of total complement activation by nanoparticles. **Methods Mol Biol**. 697: 237, 2011.

OLIVEIRA, A. G. D. Lipossomas: aplicações farmacêuticas e perspectivas futuras. **Cad Farm**, v. 9, n. 2, p. 71-76, 1993.

OLIVEIRA, P. C. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antiinflamatória de *Lychnophora passerina* (mart ex DC) Gardn (Asteraceae)**. 2010. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Ouro Preto, 2010.

OSLAKOVIC et al. Polystyrene nanoparticles affecting blood coagulation. **Nanomedicine**, v.8, p. 981-986, 2012.

OTSUKA, M.; TSUCHIYA, S. & ARAMAKI, Y. Involvement of ERK, a MAP Kinase, in the production of TGF- $\beta$  by macrophages treated with liposomes compsed of phosphatidylserine. **Biochem Biophys Res Commun**, v.324, p.1400-1405, 2004.

PIETKIEWICZ, J. et al. New approach to hydrophobic cyanine-typepho to sensitizer delivery using polymericoil-cored nanocarriers: hemolytic activity, in vitro cytotoxicity and localization in cancer cells. **Eur J Pharm Sci**. 39:322, 2010.

PUISIEUX, F & ROBLOT-TREUPEL, L. Vetorização e vetores de fármacos. **Cad Farm**. v.4, n1/2, p. 29-50, 1988.

PRINCE. E. A.; SCHRIER. S. L. **Hemoglobinopatias e anemias hemolíticas**. 2012. Disponível em: <[www.medinanet.com.br](http://www.medinanet.com.br)>. Acesso em: 12 fev. de 2014.

QUIDEL. **Microvue complement: C3a Plus EIA Kit**. Disponível em:<www.quidel.com>. Acesso em: 20 jun. 2014.

QUIDEL. **Microvue complement: SC5B-9 Plus**. Disponível em:<www.quidel.com>. Acesso em: 20 jun. 2014.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v.26, n.4, p. 550-55, 2003.

REIS, L. C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Rev Patol Trop**, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

RIBEIRO, R.R. et al. Complement activation-related pseudoallergy in dogs following intravenous administration of a liposomal formulation of meglumine antimonite. **Pesq. Vet. Bras**, 2013.

RIBEIRO, R. R. et al. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimonite. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 7, p. 2564-72, jul. 2008.

RIDDEL Jr, J. P. et al. Theories of blood coagulation. **J Pediatr Oncol Nurs**, v. 4, n. 3. p. 123-131, 2007.

SCHETTINI, D. A. et al. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **Inter J Pharm**, 2006.

SCHETTINI, D. A. et al. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome encapsulated meglumine antimonite. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n.12, 2005.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **Inter J Pharm**, 1997.

SHATTIL, S, J. Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin alpha IIB beta 3. **Thromb Haemost**, V. 70, n. 1 p. 224-228, Jul. 1993.

SIEUWERTS, A M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50 – values and cell survival. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, v 33, n 11, p. 813-823, 1995.

SILVA, S.M. **Avaliação de um protocolo terapêutico com antimonite de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, associado ao alopurionol, no tratamento da leishmaniose visceral canina**. 2011. 243 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de

Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Set. 2011.

SIQUEIRA, C. Fisiologia da coagulação. **Rev. SOCERJ**, v. XIV, n. 1, Jan, Fev, Mar., 2001.

SOUZA, L. E. **Mistura de lipossomas convencionais e furtivos: estudos farmacocinéticos em camundongos e otimização do processo de encapsulação do antimoniato de meglumina**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SUMIU, C. et al. Uptake characteristics of liposomes by rat alveolar macrophages: influence of particle size and surface mannose modification. **J Pharm Pharmacol**, v. 59, n. 1, p.75–80, 2007.

SZEBENI, J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. **Toxicology**, 216, p. 106-121, 2005.

SZEBENI, J. et al. The role of complement activation in hypersensitivity to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil®). **J. Liposome Res**, 10, p. 347-361, 2000.

SZEBENI, J. et al. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. **Adv Drug Deliver Rev**, 63, p. 1020-1030, 2011.

SZEBENI, J. et al. Hemocompatibility testing form nanomedicines and biologicals: predictive assays for complement mediated infusion reactions. **Eur. J. Nanomed**, 4, p. 33-53, 2012.

TIKSHDEEP, C et al. Liposome drug delivery: a review. **IJPCS**, v.1, 3, p. 1103-1113, Jul.-Sep. 2012.

TOMCZAK, A.C. et al. Estudo de métodos laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no centro de hematologia e hemoterapia do Paraná (Hemepar), Brasil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n.3, p. 209-214, 2010.

VALADARES et al., Prophylactic or therapeutic administration of *Agaricus blazei* Murill is effective in treatment of murine visceral leishmaniasis. **Exp Parasitol**, v. 132, p. 228-236, 2012.

VAN DEN HOVEN, J. M. et al. Complement activation by pegylated liposomes containing prednisolone. **Eur Jour Pharm Sci**. 49, p. 265-271, 2013.

VERMA, N et al. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. **Mol Cell Biochem**, v. 336, p. 127-135, 2010).

ZAGO M. A, Falcão R. P, Pasquini R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu; 2005. 1081p.

ZHANG, J. X. et al. Application of liposomes in drug development--focus on gastroenterological targets. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 1325-34, 2013.

WALSH, P. N. Roles of platelets and factor XI in the initiation of blood coagulation by thrombin. **Thromb Haemost**, v.86, p.75–82, 2001.

WASSEF et al. Toxic effects of antileishmanial reverse-phase evaporation liposomes containing dicetyl phosphate in monkeys. **Drug Delivery**, 2, p. 181-189, maio 1995.

WEISS, H. J. Flow-related platelet adhesion on subendothelium. **Thromb Haemost**, v. 74, p. 117-22, 1995.

WENDLAND, A. E; FARIAS, M. G; MANFROI, W.C. Volume plaquetário médio e doença cardiovascular. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n.5, p.371-378, 2009.

WOODLE, M.C., LASIC, D.D. Sterically stabilized liposome. **Biochim. Biophys Acta**. 1113(2), p.171-99, 14 Aug. 1992.

.

## 10 APÊNDICES

### APÊNDICE A

**Universidade Federal de Ouro Preto  
Departamento de Ciências Farmacêuticas (CIPHARMA)  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

#### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Projeto de Pesquisa:** Estabelecimento de metodologias para avaliação do efeito sobre o sistema imune e hemocompatibilidade de lipossomas carreadores de fármacos

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa *“Estabelecimento de metodologias para avaliação do efeito sobre o sistema imune e hemocompatibilidade de lipossomas carreadores de fármacos”*, sob a coordenação da pesquisadora Simone Aparecida Rezende. A pesquisa pretende avaliar as interações de sistemas de transporte de medicamentos com o sistema de defesa e com os componentes do sangue e assim, buscar uma formulação mais segura.

Sua participação é voluntária e não será necessária nenhuma coleta adicional de amostra de sangue. Sua autorização tem o objetivo de nos permitir usar o seu sangue, após a realização dos exames solicitados no Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC), para um projeto desenvolvido em laboratório de pesquisa da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. Logo em seguida, após a coleta do material biológico, o (a) sr (a) receberá todos os cuidados necessários. Depois de realizados os exames pedidos pelo seu médico, as amostras coletadas receberão um código de modo que sua privacidade seja preservada e encaminhadas para o estudo.

É importante ressaltar que não haverá nenhum benefício direto para o (a) sr (a), uma vez que as pesquisas são destinadas para a obtenção de uma formulação medicamentosa mais segura que será testada posteriormente em animais e em humanos. O (A) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração pela participação nesta pesquisa.

Vale ressaltar que a coleta de sangue inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo (embaixo da pele) de pequena gravidade. Para minimizar este risco, a coleta será

realizada por um profissional, com capacidade técnica e experiência, que estará atento para, se necessário, fazer a compressão imediata do local da punção, visando estancar o pequeno sangramento. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta. Caso, durante a coleta de sangue, seja observada qualquer anormalidade em relação a sua saúde, será imediatamente contatado o SAMU (Serviço de Atendimento Médico de Urgência) do município.

Para que possa ser aceito como um voluntário para nossa pesquisa, alguns critérios devem ser observados. Para serem incluídos no estudo, os voluntários não podem apresentar problemas de coagulação sanguínea (hemorragias, tromboembolismo/ trombose), problemas hepáticos (fígado) e doenças relacionadas ao sistema imune (sistema de defesa). Além disso, não podem fazer o uso constante de medicamentos para controlar os problemas de coagulação e de medicamentos que interferem no sistema de defesa, como os glicocorticóides ou algum outro medicamento imunossupressor. Além disso, os voluntários não podem ter ingerido bebida alcóolica recentemente. Em qualquer um dos casos citados, o paciente não poderá ser incluído no projeto de pesquisa.

Se depois de consentir sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa.

Os riscos envolvidos no momento da coleta de dados do questionário aplicado ao/a sr (a) envolvem a exposição de assuntos relacionados a sua vida privada. A fim de evitar esse tipo de situação, o questionário será aplicado individualmente pelo pesquisador e em sala reservada (isolada) no laboratório. Os dados coletados serão armazenados no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, sobre a responsabilidade do pesquisador Walyson Coelho Costa. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada em momento algum.

A suspensão da pesquisa se dará caso não sejam atendidas as solicitações exigidas pelo comitê de ética, ou não haja voluntários suficientes para a realização do estudo, ou quando houver a exposição da identidade do voluntário.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa, você deverá entrar em contato pessoalmente ou por telefone com as pesquisadoras responsáveis por este projeto, cujos nomes estão relacionados abaixo:

- Profa. Dra. Simone Aparecida Rezende - Coordenadora  
Profa. de Imunologia Básica e de Imunologia Clínica/ UFOP  
Departamento de Ciências Farmacêuticas (CIPHARMA)  
Campus Morro do Cruzeiro – Ouro Preto  
Tel.: (31) 3559-1032, (31) 9203-2266, e-mail: [rezende@ef.ufop.br](mailto:rezende@ef.ufop.br)
  
- Profa. Dra. Carmen Aparecida de Paula – Colaboradora do Projeto, professora de Hematologia Clínica da Escola de Farmácia/ UFOP  
Tel.: (31) 9195-2201

Você pode consultar também o Comitê de Ética em Pesquisa da UFOP, em caso de dúvida sobre aspectos éticos da pesquisa: Tel:(31) 3559-1368 e-mail: cep@propp.ufop.br

#### Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_,  
declaro que obtive todas as informações necessárias e esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas e, por estar de acordo, assino o presente documento em duas vias que serão assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma em minha posse.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/ \_\_\_/ \_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/ \_\_\_/ \_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

**Projeto de Pesquisa:** Estabelecimento de metodologias para avaliação do efeito sobre o sistema imune e hemocompatibilidade de lipossomas carreadores de fármacos.

Professoras responsáveis:

Simone Aparecida Rezende

Carmen Aparecida de Paula

Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Cipharma

Escola de Farmácia – UFOP

Telefones: 3559-1032, 3559-1031.

## APÊNDICE B

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

CIPHARMA- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Projeto de Pesquisa: Estabelecimento de metodologias para avaliação do efeito sobre o sistema imune e hemocompatibilidade de lipossomas carreadores de fármacos**

Aluno: Walyson Coelho Costa

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Aparecida Rezende

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Aparecida de Paula

### Questionário de entrevista

1. Nome: \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_
2. Idade: \_\_\_\_\_
3. Sexo: \_\_\_\_\_
4. Possui algum problema de saúde, como?
  - a. Problemas de coagulação sanguínea ( )
  - b. Já apresentou hemorragias ( )
  - c. Já apresentou tromboembolismo/trombose ( )
  - d. Problemas hepáticos/ fígado ( )
  - e. Alguma doença relacionada ao sistema imune ( )
  - f. Outos ( )Qual(is)?: \_\_\_\_\_
5. Faz uso de algum medicamento? ( ) sim ( ) não
  - a. Qual(is)?: \_\_\_\_\_
6. Faz ou fez ingestão recente de bebida alcóolica? ( ) sim ( ) não
  - a. Desde quando? \_\_\_\_\_

## 11 ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
OURO PRETO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estabelecimento de metodologias para avaliação do efeito sobre o sistema imune e hemocompatibilidade de lipossomas carreadores de fármacos

**Pesquisador:** Simone Aparecida Rezende

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 20406913.7.0000.5150

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Ouro Preto

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 458.230

**Data da Relatoria:** 11/11/2013

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de protocolo de pesquisa cujo projeto propõe estabelecer testes in vitro para avaliação da toxicidade de sistemas nanoestruturados. Para se estabelecer a metodologia na atuação laboratorial, serão utilizados componentes sanguíneos de 50 doadores voluntários, usuários do laboratório piloto de análises clínicas da UFOP. Ademais, será aplicado um questionário para aferição dos critérios de inclusão e exclusão da pesquisa.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo da pesquisa é implementar metodologias in vitro para a avaliação de toxicidade de nanossistemas carreadores sobre hemácias, plaquetas e leucócitos e seu efeito sobre a ativação ou supressão do sistema imune.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A intervenção com os participantes da pesquisa se dará na coleta sanguínea. Segundo o projeto os riscos são os decorrentes da dita coleta, tais como mal estar e extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena gravidade. Outra intervenção será pela aplicação de questionários, cujos riscos de exposição dos participantes será minimizado pela aplicação em sala isolada. Já os benefícios, segundo o projeto, derivarão da maior compreensão sobre a interação dos sistemas de vetorização com os diversos componentes sanguíneos, permitindo sua modificação anteriormente

**Endereço:** Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 35.400-000  
**UF:** MG **Município:** OURO PRETO  
**Telefone:** (31)3559-1368 **Fax:** (31)3559-1370 **E-mail:** cep@propp.ufop.br

Continuação do Parecer: 458.230

aos experimentos in vivo.

Logo, percebe-se adequabilidade quanto ao princípio da beneficência e da justiça.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Percebe-se da leitura do projeto e do questionário que a metodologia envolve duas atuações junto ao sujeito da pesquisa: uma no que tange à aplicação de questionário para avaliação do critério de inclusão e exclusão; outra no que tange a coleta e análise do sangue do participante.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador apresentou:

- roteiro de entrevista
- TCLE
- folha de rosto
- anuência da instituição

**Recomendações:**

não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Protocolo aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

OURO PRETO, 14 de Novembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Núncio Antônio Araújo Sól**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 35.400-000  
**UF:** MG **Município:** OURO PRETO  
**Telefone:** (31)3559-1368 **Fax:** (31)3559-1370 **E-mail:** cep@propp.ufop.br