



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS (CIPHARMA)



DÉBORA FARIA SILVA

**Avaliação imunológica do efeito do fenômeno de depuração
sanguínea acelerada no tratamento lipossomal de
camundongos infectados por *Leishmania infantum***

OURO PRETO

2016

**Avaliação imunológica do efeito do fenômeno de depuração
sanguínea acelerada no tratamento lipossomal de
camundongos infectados por *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Aparecida Rezende
Co-orientador: Prof. Dr. Jose Mario Barichello**

Ouro Preto – Minas Gerais

Maio – 2016

S586a Silva, Débora Faria.
Avaliação imunológica do efeito do fenômeno de depuração sanguínea acelerada no tratamento lipossomal de camundongos infectados por *Leishmania infantum* [manuscrito] / Débora Faria Silva. - 2016.
85f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Simone Aparecida Rezende.
Coorientador: Prof. Dr. José Mario Barichello.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. DEFAR/DEACL/DEQUI. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos, medicamentos e vacinas.

1. Leishmaniose visceral. 2. Tratamento lipossomal. 3. Tártaro emético. 4. Camundongo como animal de laboratório. I. Rezende, Simone Aparecida. II. Barichello, José Mario. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto

LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 115ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Débora Faria Silva**, com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação imunológica do efeito do fenômeno de depuração sanguínea acelerada no tratamento lipossomal de camundongos infectados por *Leishmania infantum*”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 05 de maio de 2016.

Prof.ª Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
UFOP

Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti
UFMG

Prof.ª Dra. Simone Aparecida Rezende
UFOP

Este trabalho contou com a colaboração:

Prof. Dr^a Neila Márcia Silva Barcellos - CiPharma - UFOP

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis - NUPEB - UFOP

Prof. Dr. Frederic Frezard – ICB – UFMG

Dr. Rodrigo Dian – NUPEB – UFOP

Dr^a Miriam Testasica – NUPEB - UFOP

Técnico Adriel Araújo – ICB - UFMG



Com o apoio logístico:

Laboratórios do CiPharma – UFOP:

- **Farmacologia Experimental**
- **Farmacognosia**
- **Desenvolvimento Galênico, Nanobiotecnologia e Tecnologia Farmacêutica**
- **Multiusuário**

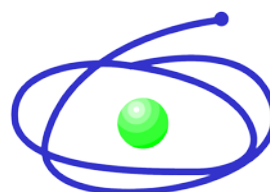


Laboratório de Imunopatologia – NUPEB/UFOP

Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados – ICB/UFMG

Centro de Ciência Animal – UFOP

Com o apoio financeiro:



C A P E S

“A todos aqueles que acreditam na verdade, na justiça e na igualdade, que não perdem a esperança mesmo frente às maiores adversidades, que confiam em Deus e lutam para fazer aquilo que deve ser feito, sem para isso perder o humor e a felicidade de viver cada dia.”

Doutor Sérgio Ricardo Silva, primo de primeiro grau. Faço das palavras dele, as minhas; e as dedico.

“As pessoas sempre culpam as circunstâncias por aquilo que acontece com elas.

 Não acredito em circunstâncias.

 As pessoas que progridem na vida são aquelas que acordam pela manhã e procuram as circunstâncias que desejam, e se não as encontram, as criam.”

Jorge Bernard Shaw

“Isso de querer ser exatamente o que se é ainda vai nos levar além.”

Paulo Leminski

AGRADECIMENTOS

Palavras talvez não consigam expressar a minha gratidão aos que participaram de mais essa conquista em minha vida.

À Deus e Nossa Senhora, por não serem falhos, em momento algum, no meu amparo e proteção. Essa é mais uma bênção que derramais sobre mim.

À minha mãe, Marcy, e minha irmã, Carla, pelo imenso amor e maior certeza da bondade de Deus em me conceder a melhor família que eu poderia ter. Ao meu pai, Carlos, por se fazer em mim a presença sentida de um anjo companheiro em vários momentos e, com isso, se eternizar vivo em meu coração.

À minha tia Glória, pela doçura e torcida de sempre. Aos demais tios e tias pelo apoio. A todos os meus primos e primas que tanto amo, amorosamente aos primos Liliane e Cleider, meus favoritos, e Tales e afilhado Henrique, meus xodós; e orgulhosamente aos primos Sérgio e Daniel, exemplos que certamente sigo nessa jornada rumo à docência.

À minha orientadora Prof. Dr^a. Simone Aparecida Rezende, por se mostrar uma pessoa tão humana e compreensiva por trás da ainda exemplar profissional pesquisadora e docente que é. Sua acolhida e ensinamentos representam para mim o que de mais importante continuarei levando em minha formação acadêmica.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Mario Barichello pela preocupação e disponibilidade de sempre em acrescentar ao meu trabalho, e aos colaboradores do projeto por tornarem possíveis a realização de várias etapas de todo o processo.

Ao meu orientador de iniciação científica, Prof. Dr. Robson José de Cassia Franco Afonso, por ser simplesmente o meu primeiro e maior exemplo e incentivo de continuação na pesquisa. Você é a minha referência e um dos que mais admiro!

Aos meus colegas de pós-graduação do CiPharma, especialmente à Tamara, Walyson, Fernanda, Luan, Stella, Daiane, Kelly, Rori e Levi, pela ajuda essencial no desenvolvimento desse projeto e, principalmente, por serem além de colegas: meus amigos!

Ao Prof. Dr. Alexandre Reis e ao Dr. Rodrigo Dian pela colaboração e grande ajuda.

Aos laboratórios, técnicos e funcionários do CiPharma, especialmente à Patrícia Capellari e aos porteiros André e Carlos, por fazerem parte da minha rotina de experimentos e pesquisa. A alegria e boa vontade de vocês em ajudarem fizeram a diferença que todos precisam para sempre levar um trabalho adiante.

Aos colegas e técnicos do NUPEB/UFOP, especialmente à Miriam, Renata e Lúcia, e à Mariana e Paula do COLTEC/UFMG pela ajuda e aprendizagem.

Aos meus amigos e amigas de Caratinga e Ouro Preto, pela fidelidade e companheirismo que não me deixaram perder a felicidade e humor de viver cada dia.

Muito obrigada a todos vocês!

RESUMO

O tratamento da leishmaniose visceral no Brasil conta, atualmente, com antimoniais pentavalentes como primeira opção terapêutica. No entanto, estes fármacos apresentam graves efeitos colaterais que podem ser reduzidos com o uso de sistemas de vetorização, dentre eles os lipossomas, que vêm sendo empregados na tentativa de se obter um maior direcionamento do fármaco ao local de ação e menor toxicidade. Em alguns casos, o tempo de circulação dos lipossomas é aumentado pelo uso de polímeros, dentre eles o polietileno glicol (PEG), que, no entanto, tem sido apontado como a causa de uma resposta imunológica conhecida como fenômeno ABC - de depuração sanguínea acelerada. Este fenômeno é observado durante a administração repetida de formulações peguiladas, resultando no aumento da depuração por macrófagos e eficácia reduzida destas formulações. Este projeto propôs avaliar o efeito do tártaro emético (TE) na forma livre e lipossomal em macrófagos J774-A1 pela produção de óxido nítrico (NO) – um importante agente leishmanicida- e o efeito do fenômeno ABC na carga parasitária de camundongos infectados por *Leishmania infantum* com TE lipossomal.

Dessa forma, camundongos BALB/c infectados foram tratados com uma primeira dose de lipossomas peguilados vazios seguida, num intervalo de uma semana, de uma segunda dose de lipossomas peguilados contendo TE para avaliar a carga parasitária do fígado, baço e medula óssea, a resposta do sistema imune e o efeito do tratamento sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos. Observou-se que nem o TE nem as formulações lipossomais de TE foram capazes de aumentar a produção de NO pelas células J774-A1.. Não houve alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos camundongos devido aos diferentes tratamentos. O tratamento com as formulações convencionais de TE foi capaz de reduzir a carga parasitária apenas no fígado e no baço e as formulações lipossomais peguiladas de TE reduziram a carga parasitária no fígado, baço e medula óssea dos animais. No entanto, a indução do fenômeno ABC não teve efeito na carga parasitária. Além disso, observou-se que o tratamento com TE livre ou com as formulações de TE provocou uma redução significativa na produção de IL-10 pelas células do baço dos camundongos. Assim, o fenômeno ABC não interferiu na carga parasitária ou na produção de citocinas e apesar do TE provocar redução da produção de IL-10, dados *in vitro* sugerem que o fármaco não interfere na produção de NO.

Palavras-chave: camundongo, tártaro emético, leishmaniose visceral, tratamento lipossomal, fenômeno ABC, polietilenoglicol.

ABSTRACT

Treatment of visceral leishmaniasis in Brazil currently has pentavalent antimonial compounds as the first therapeutic option. However, these drugs have serious side effects that may be reduced using drug delivery systems including liposomes which have been used to obtain greater success in drug targeting to the site of action and less toxicity. In some cases, the circulation time of liposome is increased by polymers including polyethylene glycol (PEG) which, however, have been implicated as the cause of an immune response known as ABC phenomenon – accelerated blood clearance. This effect is responsible by the rapid clearance of a second dose of pegylated liposomes from the circulation within a certain interval from injection of the first dose due to the removal by macrophages. This study evaluated the effect of free and liposomal tartar emetic (TE) on nitric oxide production by J774-A1 macrophages and the effect of accelerated blood clearance (ABC) phenomenon on parasite load in *Leishmania infantum* infected BALB/c mice treated with pegylated liposomes containing TE.

Thus, in order to evaluate the effect of ABC phenomenon on BALB/c treatment with TE pegylated liposomes, mice were initially treated with empty pegylated liposomes. One week later, they were treated with pegylated liposomes containing 12 mg SbIII/kg. Parasite load was evaluated by limiting dilution analysis. The effect of infection and treatment was evaluated by analysis of hematological and biochemical parameters. Cytokines production by spleen cells was also evaluated. TE liposomal formulations had no effect on nitric oxide production for J774-A1 cells. No impairment in the hepatic and renal functions and hematological parameters was observed due to the infection or treatment. Pegylated liposomal formulation of TE significantly reduced the parasite load in liver, spleen and bone marrow of *L. infantum* treated mice. However, ABC phenomenon had no effect on treatment with pegylated formulation of TE. Free drug and conventional formulation was able to reduce parasite load only in liver. Furthermore, it was observed that the treatment with free TE or TE formulations caused significant decrease in IL-10 production by splenic cells of mice. Pegylated liposomes containing TE were more effective in reducing parasite load than conventional liposomes. ABC phenomenon had no effect on treatment with pegylated liposomes.

Keywords: mice, tartar emetic, visceral leishmaniasis, liposomal treatment, ABC phenomenon, polyethylene glycol.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
1 – INTRODUÇÃO	9
2 - REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 - Leishmaniose visceral humana.....	12
2.2 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> e resposta imune.....	13
2.3 - Tratamento da leishmaniose e os antimoniais.....	16
2.4 – Tratamento lipossomal da leishmaniose	18
2.5 – O fenômeno de depuração sanguínea acelerada (ABC).....	20
3 - OBJETIVOS	23
3.1 - Objetivo geral	23
3.2 - Objetivos específicos	23
4 - MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 - Formulações lipossomais convencionais ou peguiladas e vazias ou contendo tártaro emético.....	24
4.2 – Cultura de macrófagos J774-A1.....	27
4.3 - Avaliação da viabilidade celular de macrófagos J774-A1 após tratamento com as formulações lipossomais na presença ou ausência de soro humano fresco	27
4.4 – Produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1	29
4.5 - Cepa de <i>Leishmania infantum</i>	31
4.6 - Manutenção da cepa OP46 e curva de crescimento	31
4.7 – Animais experimentais	31
4.8 – Delineamento experimental	32
4.9 - Avaliação do efeito do tratamento sobre os parâmetros hematológicos dos camundongos infectados	33
4.10 - Avaliação do efeito do tratamento sobre as funções hepática e renal dos camundongos infectados.....	33
4.11 - Obtenção de células do baço dos camundongos e dosagens de citocinas.....	33
4.12 - Quantificação de parasito no fígado, baço e medula óssea	35
4.13- Análises estatísticas	36
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

5.1- Caracterização físico-química das formulações lipossomais	37
5.2 – Curva de crescimento da cepa OP46	38
5.3 - Viabilidade de células J774-A1 tratadas com as formulações lipossomais ou com tártaro emético livre.....	39
5.4 - Efeito das formulações lipossomais sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1	42
5.5 – Avaliações bioquímicas da função hepática e renal dos camundongos infectados	49
5.6 - Avaliação dos parâmetros hematológicos dos camundongos infectados.....	52
5.7 - Quantificação de citocinas das células do baço dos camundongos tratados com as formulações lipossomais	53
5.8 - Carga parasitária de fígado, baço e medula óssea dos camundongos infectados	58
6 – RESUMO DE RESULTADOS.....	61
7- CONCLUSÃO.....	62
8 - REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	15
FIGURA 2: Modelo proposto para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes.....	18
FIGURA 3: Características estruturais dos vários tipos de lipossomas	19
FIGURA 4: Mecanismo proposto para o fenômeno de depuração sanguínea acelerada (ABC)	21
FIGURA 5: Representação das formulações lipossomais preparadas	24
FIGURA 6: Preparo das formulações lipossomais pelo método de congelamento/descongelamento.....	26
FIGURA 7: Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular	29
FIGURA 8: Representação esquemática da dosagem de óxido nítrico	30
FIGURA 9: Protocolo de tratamento de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i>	32
FIGURA 10: Curva de crescimento <i>in vitro</i> dos parasitos da cepa OP46 de <i>Leishmania infantum</i> cultivada em meio Grace's 10% SFB	39
FIGURA 11: Avaliação do efeito das formulações lipossomais e do tártaro emético livre sobre a viabilidade de macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano	41
FIGURA 12: Avaliação do efeito dos lipossomas peguilados contendo tártaro emético sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano	44
FIGURA 13: Avaliação do efeito dos lipossomas peguilados vazios sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano	45
FIGURA 14: Avaliação do efeito dos lipossomas convencionais contendo tártaro emético sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1 na ausência e	

presença de soro fresco humano	46
.....	46
FIGURA 15: Avaliação do efeito dos lipossomas convencionais vazios sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano	47
.....	47
FIGURA 16: Avaliação do efeito do tártaro emético livre sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774.A1 na ausência e presença de soro fresco humano	48
.....	48
FIGURA 17: Avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	50
.....	50
FIGURA 18: Avaliação bioquímica da função renal de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	51
.....	51
FIGURA 19 – Produção de IL-10 pelas células do baço dos camundongos tratados	54
.....	54
FIGURA 20 - Produção de TNF- α pelas células do baço de camundongos tratados	55
.....	55
FIGURA 21: Carga parasitária do fígado de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	57
.....	57
FIGURA 22: Carga parasitária do baço de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	58
.....	58
FIGURA 23: Carga parasitária da medula óssea de camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	60
.....	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características das formulações lipossomais quanto a tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e porcentagem de encapsulação	37
TABELA 2: Avaliação dos parâmetros hematológicos dos camundongos infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – fenômeno de depuração sanguínea acelerada
ALT – alanina cetoglutarato aminotransferase
AST – aspartato cetoglutarato aminotransferase
COL - colesterol
DMEM – *Dulbeco's Modified Eagles Medium*
DSPC – L- α -distearoilfosfatidilcolina
DSPE-PEG – PEG(2000)-distearoilfosfatidiletanolamina
IFN- γ - interferon gama
IL – interleucina
GSH - glutathione
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
IV – intravenosa
LC – lipossoma convencional
L. infantum – *Leishmania infantum*
LPEG – lipossoma peguilado
LPS – lipopolissacarídeo
LUV's – vesículas unilamelares
LV – leishmaniose visceral
MAC – complexo C5b-C9
MLV's – vesículas multilamelares
MTT – brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio
NO – óxido nítrico
PBS – tampão fosfato-salino
PEG - polietilenoglicol
PLA – ácido polilático
SFB – soro fetal bovino
SFM – sistema fagocítico mononuclear
SbIII – antimônio trivalente
SbV – antimônio pentavalente
TDR1 – redutase dependente de tiol
TE – tártaro emético
TNF- α - fator de necrose tumoral

1- INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia, dentre outras manifestações (BRASIL, 2014). É encontrada em quatro continentes, sendo considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países considerados em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde, 90% dos casos de leishmaniose visceral são registrados em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão. A doença vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica. No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania infantum*, encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia (LAINSON e SHAW, 1987). Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (MS, 2016).

Os antimoniais pentavalentes são a primeira opção terapêutica para o tratamento da LV no Brasil, não podendo, no entanto, ser usados em algumas situações, como em gestantes e cardiopatas. Além disso, uma baixa resposta tem sido documentada em pacientes imunodeficientes, como os portadores do HIV (COTA et al., 2014). Como tratamento de segunda escolha em humanos, tem-se a anfotericina B lipossomal (Ambisome[®] ou Abelcet[®]), que teve seu uso ampliado este ano pelo Ministério da Saúde (MS, 2013), embora os custos deste tratamento sejam muito elevados. No Brasil, todas as opções disponíveis para o tratamento da doença são feitas pela via endovenosa, não havendo ainda, um fármaco disponível por via oral.

Miekeley et al. (2002) verificaram que, após administração intramuscular de antimoniato de N-metilglucamina em pacientes com leishmaniose, ocorre conversão *in vivo* do composto orgânico estibiado para a forma iônica trivalente (SbIII), que é responsável tanto pela toxicidade do fármaco como pela atividade terapêutica do mesmo. O antimônio é considerado um agente clastogênico, mas não mutagênico no seu estado trivalente, sendo esta espécie responsável pelos principais efeitos tóxicos. Possui grande afinidade pelo baço e pelo sangue e se acumula em órgãos com fluxo sanguíneo elevado, como rins e fígado. Sua eliminação está relacionada com a mudança de valência após metabolização no organismo vivo. A evidência de metilação de antimônio em mamíferos é baixa. Assim sendo, parece que o organismo não possui mecanismos eficientes de detoxificação do Sb(III) (RATH et al., 2003).

A utilização de lipossomas para o tratamento da leishmaniose tem sido proposta por vários estudos durante as últimas décadas (NEW et al., 1978; ALVING et al., 1978; 1984a; SCHETTINI et al., 2003; 2006a; RIBEIRO et al., 2008). Estes caracterizam-se como vesículas esféricas microscópicas constituídas por uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios separadas entre si e do meio externo por compartimentos aquosos. Podem carrear substâncias hidrofílicas ou lipofílicas em seus compartimentos aquosos ou adsorvidos à membrana, respectivamente (FRÉZARD et al., 2005; BATISTA et al., 2007; MACHADO; GNOATTO; KLUPPEL, 2007). Conforme as necessidades farmacológicas desejadas, os lipossomas podem ser ajustados quanto a suas características de tamanho, lamelaridade, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno (RIBEIRO et al., 2008).

O direcionamento obtido pela vetorização de fármacos em modelos lipossomais pode ser explicado por características como tamanho e composição, que determinam o padrão de distribuição destas vesículas no organismo. Os lipossomas convencionais, quando administrados por via endovenosa, têm como alvo órgãos como fígado e baço, onde são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Por outro lado, em órgãos apresentando capilares contínuos como coração, rins, cérebro, músculos e pele, a concentração destas vesículas é diminuída. A ligação de opsoninas (IgG ou componente C3b do complemento) aos lipossomas pode acelerar o processo de fagocitose, sendo que quanto maiores forem as vesículas, mais rápido este processo ocorrerá (FRÉZARD et al., 2005).

A escolha do tipo de lipossoma a ser empregado deve ser feita de acordo com as características da infecção, principalmente a localização do parasito. A *Leishmania infecta* células do SFM, onde estabelece seu ciclo no hospedeiro vertebrado, e o destino natural dos lipossomas convencionais são os órgãos naturalmente ricos nessas mesmas células. Dessa forma, pode-se atribuir a esses fatores os bons resultados alcançados por essas terapias experimentais (NEW et al., 1978; ALVING et al., 1978; 1984a; FRÉZARD et al., 2005).

Lipossomas de longa duração *in vivo* são obtidos por diferentes métodos, incluindo o revestimento da superfície lipossomal com componentes hidrofílicos naturais como o monossialogangliosídeo e fosfatidilinositol, ou com polímeros hidrofílicos sintéticos, especificamente, os polietilenoglicóis (PEG) (SAGRISTÁ et al., 2000; TORCHILIN, 2005). O tempo de circulação dos lipossomas é aumentado pelo revestimento com polímeros que formam uma camada hidrofílica superficial e retardam

o reconhecimento e conseqüente associação com as opsoninas no plasma e, desse modo, inibe o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do SFM, principalmente as células de Kupffer no fígado (NEEDHAM et al., 1992).

Os lipossomas peguilados representam um sistema transportador de longa circulação adequado para aplicações *in vivo*, porém não são veículos inertes *in vivo*. Assim, o PEG vem sendo apontado como a causa de uma inesperada resposta imunológica conhecida como “fenômeno ABC”, de depuração sanguínea acelerada. Este fenômeno tem sido observado durante a administração repetida de sistemas de vetorização de fármacos com superfícies peguiladas, como lipossomas e nanopartículas peguilados, resultando no aumento da depuração e eficácia reduzida dos fármacos vetorizados nestes sistemas (LILA; KIWADA; ISHIDA, 2013). Assim, uma primeira administração de lipossomas peguilados vazios pode interferir significativamente na farmacocinética de lipossomas peguilados administrados nas doses subsequentes, através do fenômeno ABC. Neste contexto, o objetivo deste projeto foi avaliar o efeito do tratamento com lipossomas peguilados contendo TE após indução do fenômeno ABC sobre a carga parasitária de órgãos alvo da doença, a saber, fígado, baço e medula óssea, sobre a resposta do sistema imune e sobre a função renal e hepática de camundongos infectados por *Leishmania infantum*.

A hipótese deste trabalho foi que o tratamento de camundongos infectados com *Leishmania infantum* com o tártaro emético em lipossomas peguilados levaria à diminuição da dose de fármaco necessária para o tratamento e, conseqüentemente, de sua toxicidade, com potenciação da ação do Sb(III), fármaco com alta capacidade leishmanicida com as formulações propostas. Nesse sentido, a obtenção de resultados positivos poderia levar à proposição da reutilização do antimônio trivalente, um potente antiparasitário com utilização limitada em decorrência de graves efeitos colaterais, efeitos esses que poderiam ser minimizados pela utilização de formulações lipossomais e ativação do fenômeno ABC.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Leishmaniose visceral humana

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por várias espécies de protozoários unicelulares digenéticos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903; LAINSON et al., 1979). A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave de leishmaniose e apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo. É caracterizada por lesões crônicas de envolvimento sistêmico (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). O parasito é inoculado na pele e migra, via circulação linfática e sanguínea, infectando células do SFM de diferentes órgãos como baço, linfonodos, fígado e medula óssea (MAURICIO et al., 2000; LUKES et al., 2007). Aproximadamente 90% dos casos de LV ocorrem em cinco países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão, enquanto 90% dos casos na América ocorrem no Brasil (WHO, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), as leishmanioses podem ser classificadas em quatro formas clínicas: leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral. Os fatores pelos quais são induzidas diferentes formas clínicas da doença incluem a virulência do parasita e características genéticas e da resposta imune do hospedeiro (HERWALDT, 1999; SILVEIRA et al., 2005; PINHEIRO et al., 2006).

A leishmaniose visceral, também conhecida como “Kala-azar” é a forma mais grave da doença e caracteriza-se por febre alta, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e anemia. Essa forma clínica possui grande importância epidemiológica devido à sua elevada taxa de mortalidade que ocorre principalmente em pacientes não tratados (DESJEUX et al., 2004, MURRAY et al., 2005). Pode ocorrer também caquexia, diarreia e broncopneumonia. No entanto, apenas uma pequena parcela dos indivíduos infectados desenvolve sintomas da doença (BRASIL, 2006).

Nas Américas, a principal espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão da *L. infantum* é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, espécie de hábitos alimentares oportunistas (DIAS et al., 2003). O *Lutzomyia longipalpis* é considerado o flebotomíneo mais adaptado aos ambientes urbanos modificados pelo homem. A presença desta espécie já era reconhecida desde 1936 por Evandro Chagas nos principais focos de LV.

Sua distribuição inclui áreas silvestres, rurais, suburbanas e urbanas (GONTIJO e MELO, 2004).

A LV zoonótica está limitada a reservatórios pertencentes a um grupo específico de mamíferos da família *Canidae*, sobretudo cães, raposas e lobos, podendo ainda envolver outros animais como reservatórios secundários, por exemplo, os marsupiais e roedores (GONTIJO e MELO, 2004).

A etiologia da LV na América do Sul foi atribuída à *Leishmania chagasi* por Cunha & Chagas em 1937. A classificação usada hoje em dia dos parasitas do subgênero *Leishmania* foi a proposta pelos autores Lainson e Shaw (2005), que dividiram *Leishmania (L.) infantum* em duas subespécies: *L. (L.) infantum infantum* (Velho Mundo) e *L. (L.) infantum chagasi* (Novo Mundo). A nomenclatura *Leishmania infantum* vem sendo adotada por pesquisadores atuantes na área.

Os modelos animais para estudo da leishmaniose incluem principalmente o cão, o hamster e o camundongo. O cão vem sendo mais amplamente utilizado na pesquisa nos últimos anos, sendo um dos mais importantes reservatórios da doença (LEAL et al., 2014; SOARES et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). Por serem altamente susceptíveis, os hamsters têm sido utilizados em estudos de fármacos, vacinas e mecanismos de imunossupressão (MOREIRA et al., 2012; HENDRICKX et al., 2015). Os camundongos BALB/c são o melhor modelo animal de auto-cura ou infecção subclínica por *Leishmania infantum* e apresentam, assim como o homem, apresentam o gene SLC-11A1 que auxilia no combate ao parasito ao retirar ferro e manganês de dentro do fagolisossoma, essenciais à sobrevivência da *Leishmania* (NIETO et al., 2011). São animais de fácil manipulação, de manutenção prática e de baixo custo, com possibilidade de obtenção em grande escala em curtos períodos de tempo. Além disso, há uma grande disponibilidade de reagentes e anticorpos específicos para este modelo animal, o que aumenta a chance de sucesso nas respostas obtidas em desenhos experimentais (GARG & DUBE, 2006).

2.2- Ciclo biológico da *Leishmania* e resposta imune

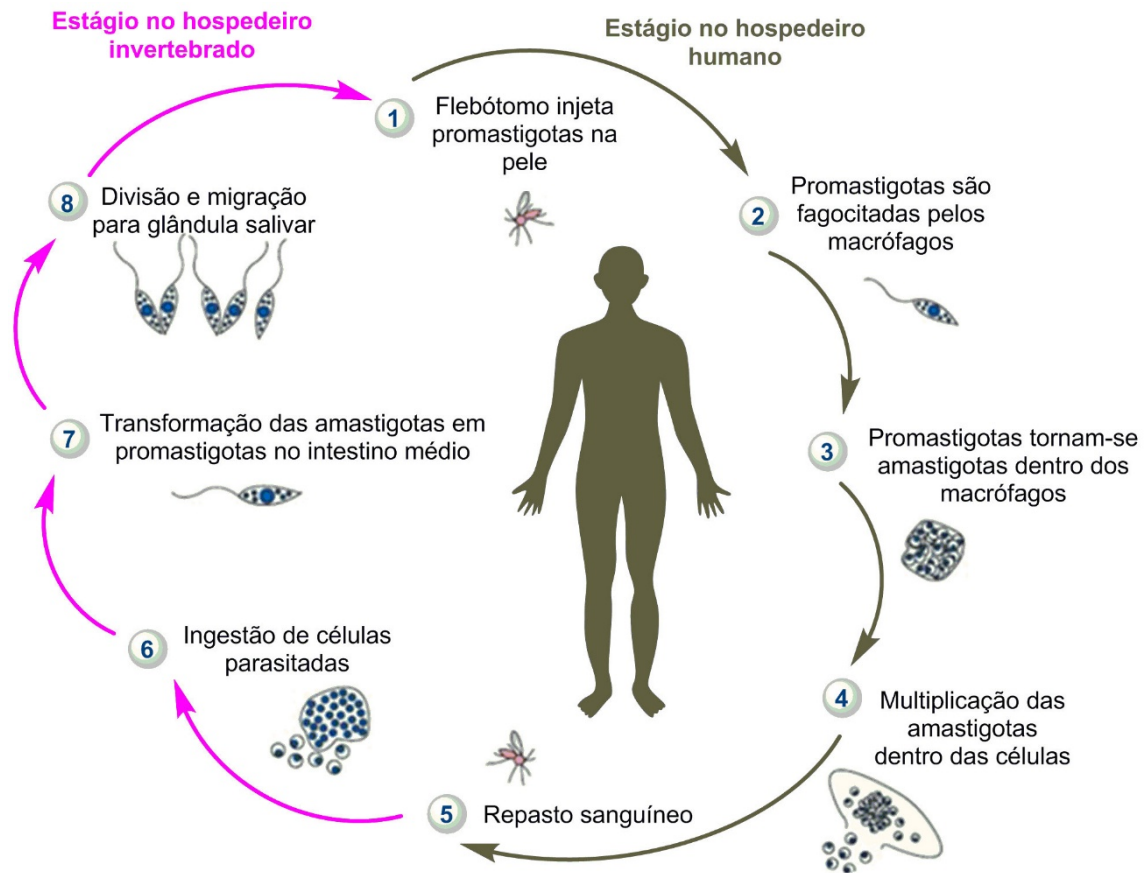
O protozoário *Leishmania* apresenta ciclo biológico heteroxênico, alternando-se entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. De acordo com a fase do ciclo de vida, o parasito pode apresentar duas formas evolutivas: amastigota e promastigota. O vetor *Lutzomyia* é conhecido popularmente como cangalha, mosquito-palha ou birigui.

Durante sua alimentação hematófaga, o inseto pica o animal (roedores, cães e raposas) ou o indivíduo parasitado e retira a linfa e sangue contendo células do SFM infectadas com *Leishmania*. Estas se desenvolvem no interior do tubo digestório do inseto e migram em direção à porção anterior do estômago. Durante a migração, passam da forma amastigota para promastigota e multiplicam-se diversas vezes por divisão binária, elevando o número de protozoários e dificultando a passagem de alimento pelo intestino anterior do inseto. A presença dos protozoários no aparelho bucal do inseto provoca uma irritação e o induz a tentar a se livrar do incômodo. Enquanto se alimenta, o vetor inocula a *Leishmania* em novos hospedeiros.

No hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* têm como habitat as células do SFM (monócitos e macrófagos). Contudo, a saliva do flebotomíneo é regurgitada juntamente com formas metacíclicas e porções deste material gelatinoso a cada picada é capaz de impedir a morte dos parasitos pela ação inibitória de macrófagos acarretando redução na produção de óxido nítrico e radicais superóxido por essas células. Assim, os parasitos passam da forma promastigota para amastigota e se reproduzem, novamente por divisão binária, no interior dos vacúolos dos macrófagos e provocam a lise da célula e a consequente liberação dos parasitos, iniciando uma reação inflamatória. Os parasitos liberados podem infectar novas células, ampliando a infecção nos hospedeiros suscetíveis, dependendo de suas características genéticas e da resposta imune do organismo (MAURICIO et al., 2000; LUKES et al., 2007). Por fim, todos os órgãos com alta concentração de células do SFM estão parasitados nos casos de leishmaniose visceral, especialmente fígado, baço e medula óssea (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). A **Figura 1** ilustra o ciclo de vida do parasito:

Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania*.

Fonte: PERASOLI, F., B. 2016.



O sistema complemento é ativado em resposta às formas promastigotas metacíclicas, não ocorrendo, entretanto, lise decorrente de formação de poros na membrana do parasito (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). Quando a forma promastigota procíclica (estágio no vetor) da *Leishmania* se transforma em forma metacíclica infectiva e penetra no hospedeiro vertebrado, esta sofre alterações na membrana, que são capazes de impedir a inserção do complexo C5b-C9 (MAC) do sistema complemento do hospedeiro (PUENTES et al., 1990). Esta modificação na membrana ocorre principalmente através do alongamento na estrutura do lipofosfoliglicano (LPG), o que dificulta a ligação do complexo MAC do sistema complemento ao parasita (McCONVILLE et al., 1992).

A ativação das células T ocorre nos linfonodos que drenam o sítio de infecção e constitui-se como parte importante na resposta imune adaptativa ao parasito. Quando as células T aparecem tardiamente à infecção, o parasito pode induzir o hospedeiro a modular a sinalização e apresentação de antígenos que favoreçam a progressão da

doença, com consequente aumento de IL-4 (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). As células T CD4+ ativadas sofrem expansão e se diferenciam em células Th1, passando a secretar IFN- γ e TNF- β contribuindo para a eliminação do parasito por processos que incluem a ativação de macrófagos, ou em Th2, secretando IL-4, IL-5 e IL-13, em indivíduos susceptíveis ou resistentes, respectivamente (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem a capacidade de evasão da resposta imune intracelular. Uma forma de controle exercida pelos macrófagos infectados é a ativação de células T efectoras por meio da apresentação de antígenos e fatores co-estimuladores aos linfócitos. Dentre esses fatores tem-se a interleucina 12 (IL-12), que é o principal ativador da produção de interferon gama (IFN- γ) e da diferenciação de células T em Th1. Assim, a IL-12 é considerada essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva contra patógenos intracelulares. Assim sendo, uma forma eficiente de escapar da destruição pelo sistema de defesa do hospedeiro é o controle da expressão de IL-12 pelo parasito (McDOWELL & SACKS, 1999).

2.3 – Tratamento da leishmaniose e os antimoniais

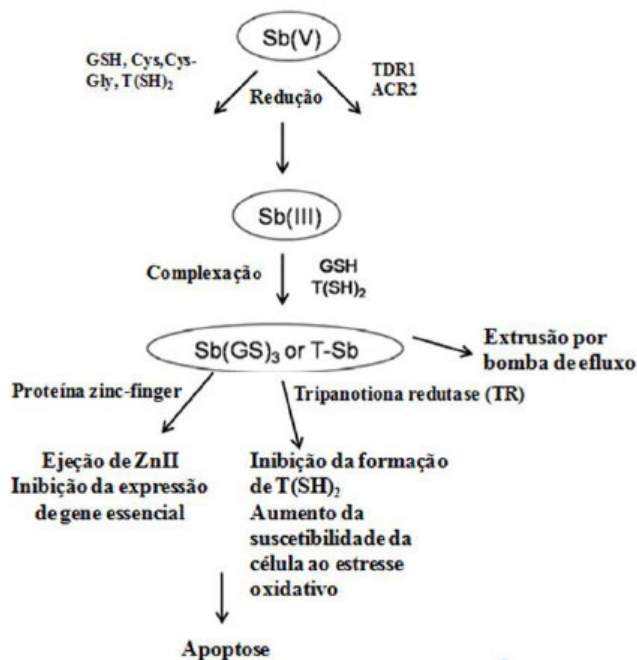
Apesar do potencial de gravidade dos efeitos tóxicos que apresentam, os antimoniais pentavalentes são medicamentos de primeira linha no tratamento das leishmanioses, sendo considerados fármacos de escolha pela Organização Mundial de Saúde e pelo Ministério da Saúde do Brasil (TAVARES, MARINHO, 2005; BRASIL, 2013). Entre as possíveis reações ao tratamento, destacam-se, pela gravidade, a insuficiência respiratória (DIETZE, 2003; TAVARES; MARINHO, 2005; TONELLI; FREIRE, 2000) e a parada cardíaca súbita (FALQUETO; SESSA, 2005; RIBEIRO et al., 1999; SAMPAIO et al., 1998). Como tratamento de segunda escolha, tem-se a anfotericina B lipossomal (Ambisome[®] ou Abelcet[®]), que teve seu uso ampliado este ano pelo Ministério da Saúde (MS, 2013), embora os custos deste tratamento sejam muito elevados.

O cientista brasileiro Gaspar Vianna introduziu, em 1912, os sais de antimônio para o tratamento das leishmanioses, sob a forma de TE, um antimonial trivalente (SbIII) que teve seu uso interrompido a partir da década de 40 devido aos graves efeitos colaterais e à descoberta de compostos menos tóxicos, os antimoniais pentavalentes (SbV) (BERMAN, 2003).

Para que o mecanismo de ação proposto para os antimoniatos ocorra, é importante a redução do SbV a SbIII, a forma tóxica e mais ativa deste metal (GOODWIN; PAGE, 1943; SHAKED-MISHAN *et al.*, 2001; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c), através de agentes redutores como a glutathiona (GSH), em uma reação de óxido-redução favorecida em pH ácido e temperaturas elevadas. Enzimas específicas do parasito, como a redutase dependente de tiol (TDR1), também são responsáveis pela redução de SbV a SbIII e estão presentes em concentrações 10 vezes maiores nas formas amastigotas, as quais acumulam antimoniais pentavalentes e são mais sensíveis aos antimoniais trivalentes. O transportador chamado aquagliceroporina foi identificado em *Leishmania* e apresenta-se como o principal transportador do SbIII (GOURBAL *et al.*, 2004). A ação tóxica do SbIII está relacionada a sua alta afinidade por ligantes contendo grupos nitrogênio e sulfidril, destacando-se tióis, peptídeos, proteínas e enzimas do hospedeiro (FRÉZARD *et al.*, 2001a; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c). A formação de complexos estáveis entre o SbIII e os tióis acarreta a morte celular da célula do hospedeiro (FRÉZARD *et al.*, 2001a; SUN; YAN; CHENG, 2000). Assim que o SbIII entra na célula, este é conjugado a T(SH)₂ e o complexo tanto pode ser sequestrado dentro de vacúolos, como exsudado por bombas dependentes de ATP e um tipo de transportador (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1996; LÉGARÉ *et al.*, 2001). O modelo proposto para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes encontra-se ilustrado na **Figura 2**. A resistência da *Leishmania* aos antimoniais é decorrente tanto do aumento da concentração de tióis quanto da baixa expressão de transportadores.

Figura 2: Modelo proposto para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. De acordo com o modelo de pró-fármaco, o SbV é reduzido a SbIII e este exerce a atividade leishmanicida sobre os parasitos.

Fonte: Adaptado de FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009c.



O antimônio localiza-se, na tabela periódica, logo abaixo do arsênio, pertencendo ao grupo dos metais pesados. Apresenta, portanto, propriedades tóxicas e químicas comparáveis às de outros metais pesados. Pacientes tratados com N-metilglucamina apresentam entre 15 e 25% de SbIII no soro e 50% na urina (ROBERTS; HERMAN; RAINEY, 1995). Os antimoniais trivalentes são dez vezes mais tóxicos do que os pentavalentes e apresentam excreção mais lenta (RATH et al., 2003). Portanto, o SbIII é possivelmente um importante fator na toxicidade atribuída ao uso da N-metilglucamina (FRÉDÉRIC; SCHETTINI, 2005).

2.4- Tratamento lipossomal da leishmaniose

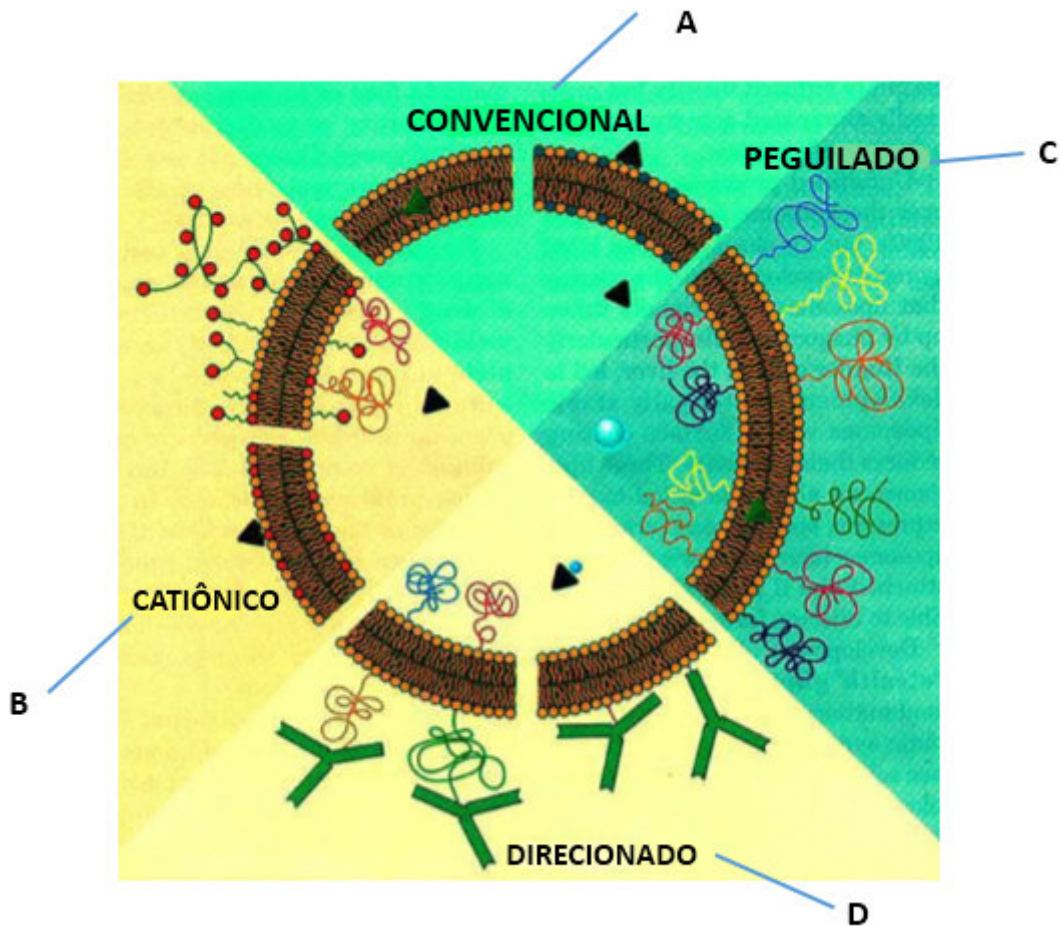
Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas adsorvidas na membrana. Por serem biodegradáveis e biocompatíveis, são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas. Os lipídeos mais

utilizados nas formulações de lipossomas são os que apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiolina, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. (BATISTA et al., 2007).

Na evolução de seu emprego como carreadores de fármacos, algumas alterações foram realizadas na estrutura básica dos lipossomas possibilitando maior aplicação terapêutica (**Figura 3**), sendo também classificados quanto às características de interação com sistemas biológicos (TORCHILIN, 2005).

Figura 3: Características estruturais dos vários tipos de lipossomas: (A) convencionais - fármaco hidrofílico no interior do lipossoma ou fármaco lipofílico adsorvido ou inserido na bicamada lipídica; (B) catiônicos; (C) de longa circulação ou furtivos (Stealth[®]) – com polímero hidrofílico na superfície – exemplo: peguilados; (D) direcionados ou sítio-específicos – com anticorpos ligantes exemplificados.

Fonte: Adaptado de BATISTA et al., 2007.



O processo de preparação dos lipossomas é crucial para determinar o tipo de estrutura a ser obtida. O desenvolvimento bem sucedido de uma formulação depende de fatores como seleção dos lipídios, natureza da substância encapsulada, método utilizado na incorporação do agente a ser encapsulado e metodologia de obtenção das vesículas (FRÉZARD et al., 2005). Existem várias metodologias (HOPE et al., 1986) para a preparação de lipossomas, as quais, de modo geral, são compostas por três etapas básicas: 1) diluição dos fosfolipídios em solvente orgânico seguida de evaporação deste para obtenção do filme lipídico; 2) hidratação do filme lipídico em meio aquoso; 3) redução do tamanho da vesícula e/ou do número de camadas, se for o caso.

A encapsulação de substâncias em lipossomas permite sua distribuição corporal diferenciada, podendo apresentar maior estabilidade, excreção reduzida, modificadas interações com células hospedeiras, além de atingir alvos específicos, como células e tecidos, aumentando a potência e/ou reduzindo a toxicidade da substância encapsulada. O tipo de lipossoma utilizado para uma determinada finalidade está diretamente relacionado à sua composição e estrutura e, dependendo da forma de administração, pode alcançar diferentes sítios no organismo (LASIC, 1998).

2.5 - O fenômeno de depuração sanguínea acelerada (ABC)

Lipossomas peguilados representam um sistema transportador de longa circulação adequado para aplicações *in vivo* e, apesar da introdução clínica de um número cada vez maior de lipídios conjugados ao PEG, este último tem sido apontado como a causa de uma inesperada resposta imunológica, o “fenômeno ABC”. Este fenômeno tem sido extensamente observado durante a administração repetida de sistemas de vetorização de fármacos peguilados, como lipossomas e nanopartículas peguilados, resultando no aumento da depuração e eficácia reduzida dos fármacos vetorizados nos lipossomas (LILA; KIWADA; ISHIDA, 2013).

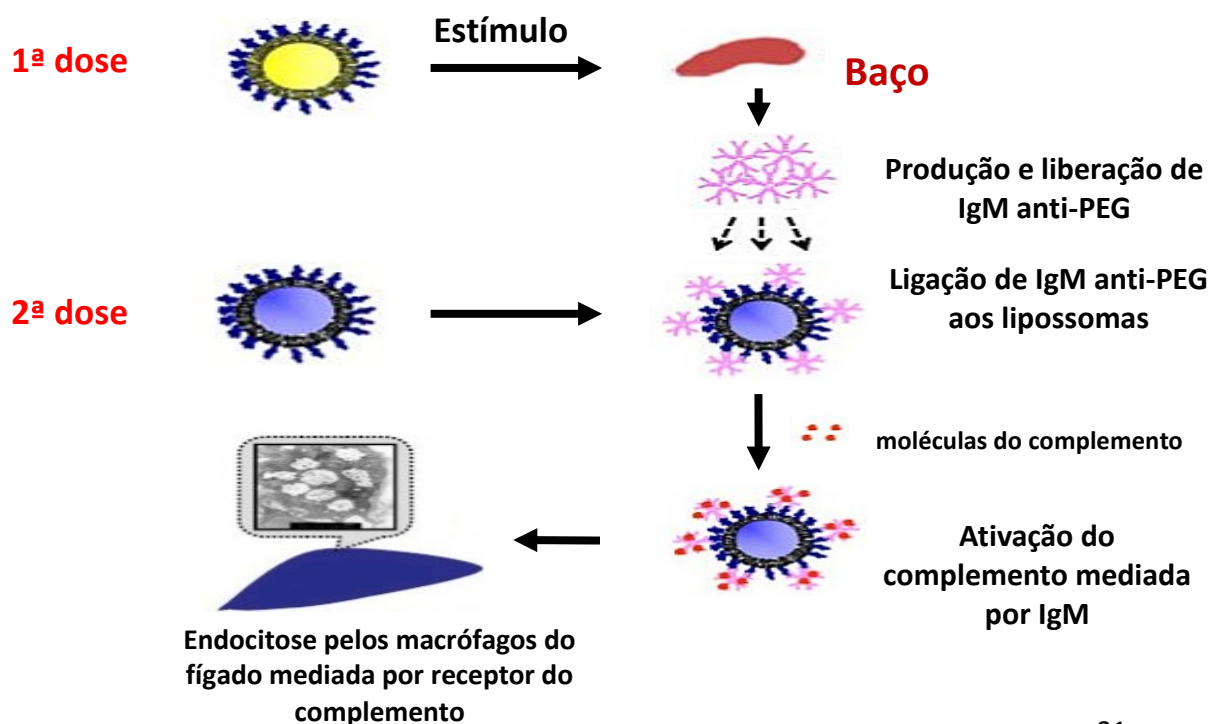
O primeiro relato sobre o fenômeno ABC foi feito por Dams et al. (2000). Eles mostraram que, após a injeção de lipossomas peguilados vazios em ratos ou em macacos *rhesus*, uma segunda dose de lipossomas peguilados com um fármaco era rapidamente eliminada da circulação sanguínea quando o intervalo entre a primeira e a segunda injeção era entre 5 e 21 dias. Sugeriram ainda que algum fator solúvel no soro era o responsável pela indução do fenômeno ABC. Mais tarde, Laverman et al. (2001) identificaram duas fases do fenômeno ABC: a fase de indução, após a primeira

administração, em que o sistema imune é "ativado"; e, a fase de efetivação, na administração subsequente, em que os lipossomas peguilados são rapidamente eliminados da circulação sanguínea.

Ichihara et al. (2009) demonstraram que o fenômeno ABC era observado em camundongos BALB/c deficientes em células T, mas não em camundongos BALB/c deficientes em células T e B. Sabe-se que camundongos BALB/c deficientes em células T são capazes de produzir somente IgM anti-PEG, mas não IgG anti PEG após estimulação com lipossomas peguilados. Estes dados comprovaram que o anticorpo IgM anti PEG produzido pelas células B do baço pode desempenhar um papel importante na indução do fenômeno ABC.

O mecanismo proposto para o fenômeno ABC (**Figura 4**) é que, uma vez que os lipossomas peguilados (primeira dose) atingem o baço, as células B reativas na zona marginal esplênica são ativadas e há produção de IgM anti-PEG, que é independente das células T. Na segunda dose, se os Ac IgM anti-PEG produzidos em resposta à primeira dose ainda estiverem na circulação sanguínea, se ligam aos lipossomas peguilados com ativação do complemento e estes são capturados por macrófagos do fígado através de endocitose mediada pelo complemento (LILA; KIWADA; ISHIDA, 2013).

Figura 4: Mecanismo proposto para o “fenômeno de depuração sanguínea acelerada (ABC)”.
Fonte: Adaptado de LILA; KIWADA; ISHIDA, 2013.



Alguns lipossomas terapeuticamente relevantes são reconhecidos pelo sistema imunitário como estranhos, e a resposta imune inata ou específica resultante pode ser adversa ao hospedeiro. A resposta inata envolve a ativação do complemento (C) que, através da liberação de anafilatoxinas (C5a, C3a), causa o fenômeno da hipersensibilidade denominada pseudo-alergia relacionada à ativação do complemento (CARPA) (Szebeni e Barenholz, 2009).

A CARPA representa uma barreira à utilização clínica de lipossomas reactogênicos em pacientes cardíacos, por ter como principal consequência transtornos cardiopulmonares. A resposta imune adversa aos lipossomas envolvendo a imunidade específica é exemplificada por pacientes tratados com lipossomas peguilados, que provoca o fenômeno ABC (Szebeni e Barenholz, 2009).

O tratamento da leishmaniose visceral é feito com medicamentos com inúmeros relatos de efeitos colaterais, toxicidade e casos de resistência (WHO, 2010). Na perspectiva de contornar essas limitações, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos na linha da vetorização desses fármacos e formas de se obter um maior direcionamento destes ao local de ação desejado, de forma a reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia do tratamento dos pacientes acometidos pela doença (Durand et al., 1997; Heurtault et al., 2001; Manandhar et al., 2008; Ishida et al., 2008). Assim, este projeto propôs avaliar o efeito do tratamento com lipossomas peguilados contendo TE e o efeito do fenômeno ABC sobre a carga parasitária do fígado, baço e medula óssea; sobre a resposta do sistema imune, parâmetros hematológicos e funções cardíaca, renal e hepática de camundongos infectados por *Leishmania infantum*.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar o efeito do fenômeno de depuração sanguínea acelerada na resposta do sistema imune e redução da carga parasitária de camundongos infectados por *Leishmania infantum* após a administração de lipossomas peguilados contendo tártaro emético.

3.2- Objetivos específicos

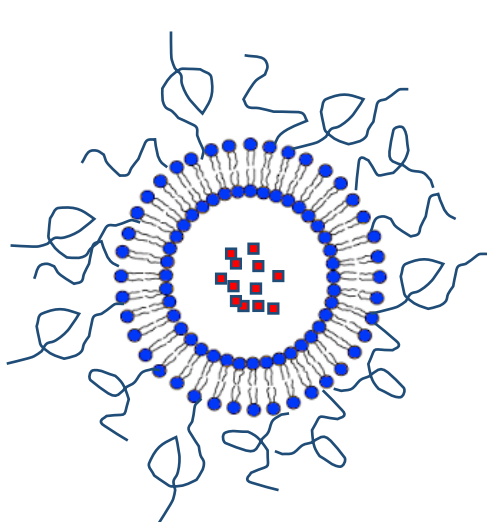
- 1- Preparar e caracterizar formulações lipossomais contendo TE;
- 2- Avaliar o efeito do tratamento com TE na forma livre e lipossomal em macrófagos J774-A1 pela produção de óxido nítrico;
- 3- Avaliar o efeito do tratamento sobre os componentes sanguíneos e funções hepática e renal de camundongos infectados por *Leishmania infantum*;
- 4- Avaliar o efeito do tratamento com lipossomas peguilados contendo TE, após administração de lipossomas vazios, na produção de citocinas por células do baço de camundongos infectados por *Leishmania infantum*;
- 5- Avaliar o efeito do tratamento com lipossomas peguilados contendo TE, após administração de lipossomas vazios, na carga parasitária do fígado, baço e medula óssea de camundongos infectados por *Leishmania infantum*.

4- MATERIAL E MÉTODOS

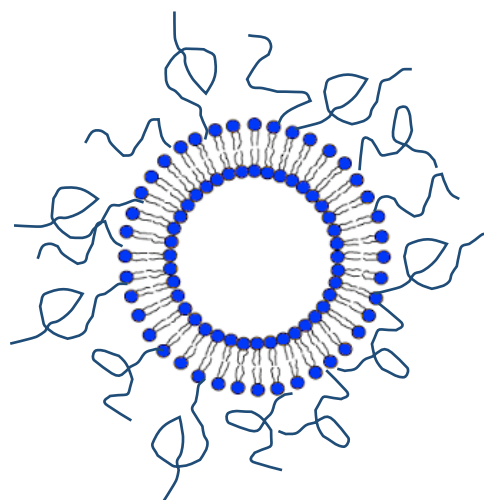
4.1- Formulações lipossomais convencionais ou peguiladas e vazias ou contendo TE

Foram preparados quatro tipos de formulações lipossomais, todas contendo colesterol (COL) e L- α -distearoilfosfatidilcolina (DSPC), constituídas ou não por PEG(2000)-distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG) na superfície, e vazias ou contendo TE, como esquematizado na **Figura 5**:

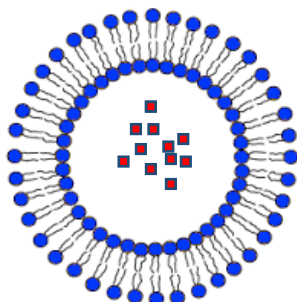
Figura 5: Representação das formulações lipossomais preparadas.



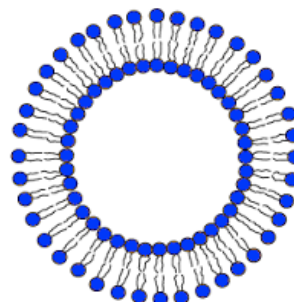
Lipossoma peguilado contendo SbIII



Lipossoma peguilado vazio



Lipossoma convencional contendo SbIII



Lipossoma convencional vazio

4.1.1- Material

Tártaro emético (TE, $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$ – referência: 383376) e COL foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA). DSPC e DSPE-PEG foram fornecidos pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). A água ultrapura foi obtida através do Symplicity System 185, Milipore, USA. O clorofórmio foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.2- Composição dos lipossomas

Lipossomas convencionais eram compostos pelos lipídeos DSPC e COL, na relação molar de 5:4 respectivamente, em um total de lipídeos de 76,9 g/L. Os lipossomas peguilados eram compostos pelos lipídeos DSPC, COL e DSPE-PEG, na relação molar de 5:4:0,3 respectivamente, em um total de lipídeos de 120 g/L.

4.1.3- Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados segundo o método de congelamento/descongelamento proposto por Mayer e colaboradores (1985), seguido de extrusão através de membranas de policarbonato de 200 nm, como proposto por Nayar e colaboradores (1989).

Primeiramente, os lipídeos foram solubilizados em clorofórmio e submetidos à rota evaporação até a formação de um filme lipídico na parede de um balão volumétrico. O filme lipídico foi hidratado com solução tampão de PBS (150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7,2) para obtenção de vesículas multilamelares (MLV's) vazias (sem o fármaco) ou com solução aquosa de 80 g/L de tártaro emético para obtenção de lipossomas contendo o fármaco.

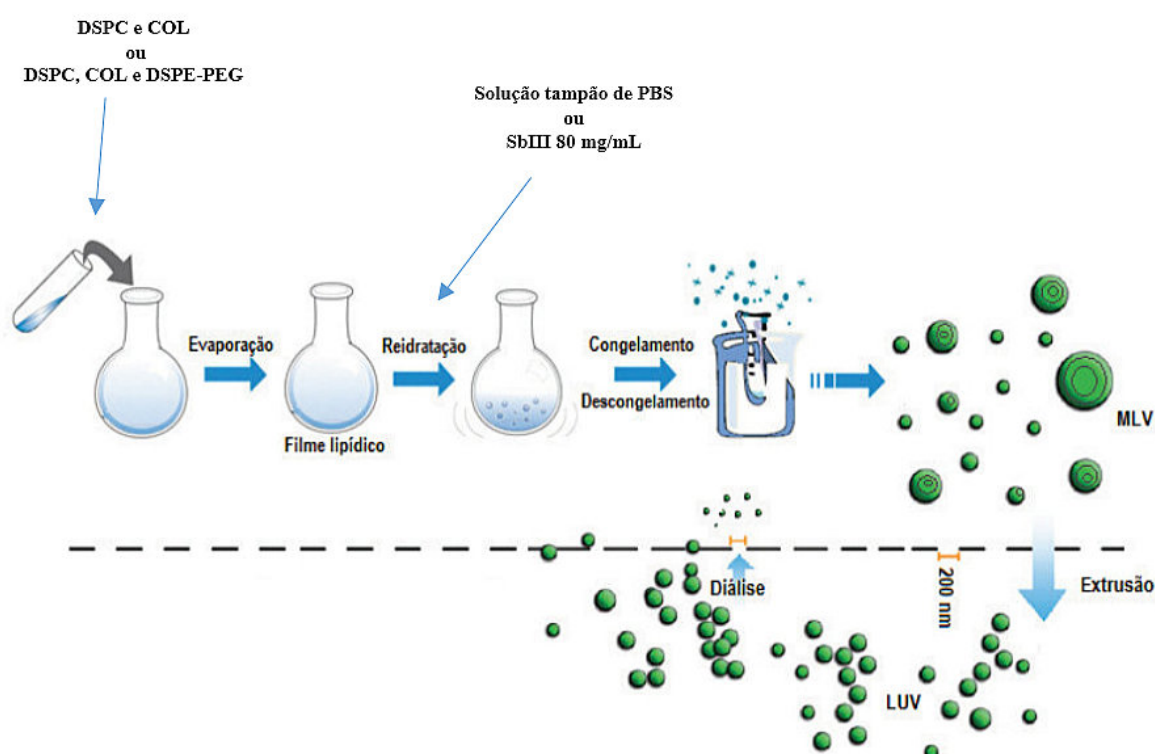
As soluções obtidas foram submetidas a dez ciclos de congelamento e descongelamento utilizando nitrogênio líquido e banho-maria a 60°C, respectivamente. Em seguida, para formação de vesículas unilamelares (LUV's) a partir das MLV's, as soluções lipossomais foram submetidas a dez ciclos de extrusão através de duas membranas de policarbonato de 200 nm de diâmetro, sob pressão de 250 psi e temperatura controlada de 60°C.

No preparo das formulações lipossomais contendo fármaco, o antimônio não encapsulado nas vesículas durante o processo foi separado dos lipossomas formados mantendo-se a preparação em diálise em PBS durante 24 horas, sobre agitação leve e constante, com realização de troca do meio de 12 em 12 horas.

O processo completo de preparo das formulações lipossomais apresenta-se de forma esquemática na **Figura 6**:

Figura 6: Preparo das formulações lipossomais pelo método de congelamento/descongelamento.

Fonte: Adaptado de VIDAL, 2009.



4.1.4- Caracterização físico-química dos lipossomas

As quatro formulações lipossomais foram caracterizadas quanto a tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta e porcentagem de encapsulação. O tamanho dos lipossomas, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons através do aparelho Nanosizer N5 (Beckman Coulter, EUA), no Laboratório Multiusuário do CiPharma/UFOP. Foram efetuadas

leituras de cinco amostras em triplicatas, para cada tipo de formulação, sendo que para a medição do tamanho as formulações foram dispersas em água mili-Q e para a medição do potencial zeta as formulações foram dispersas em NaCl 1mM.

A quantificação de SbIII encapsulado nas formulações lipossomais (porcentagem de encapsulação) foi realizada pela técnica de absorção atômica, através de espectrômetro ótico Ciros CCD (Spectro) com plasma acoplado indutivamente (ICP/OES) do Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2- Cultura de macrófagos J774-A1

Macrófagos murinos J774-A1 (catalog n^o. TIB-67) foram cultivados em garrafas de cultura (TPP, Suíça), em *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM) – *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 M (Plus One – Pharmacia Biotech), pH 7,2 e mantidos em estufa a 37°C e 5% CO₂. Para os 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 células foram ressuspensas em DMEM 10% SFB a uma concentração de 1×10^5 células/poço em placa de 96 poços para a determinação da viabilidade celular.

4.3- Avaliação da viabilidade celular de macrófagos J774-A1 após tratamento com as formulações lipossomais na presença ou ausência de soro humano fresco

Para avaliar o efeito das formulações lipossomais na viabilidade de macrófagos J774-A1, foi usado o ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio), segundo MOSMANN et al., (1983), modificado por SIEUWERTS et al., (1995) e CAPELARI – OLIVEIRA et al., (2011). Os testes foram realizados na presença e ausência de soro humano fresco (5%), obtido por coleta de sangue de voluntário, seguido de centrifugação de separação para obtenção do soro. O

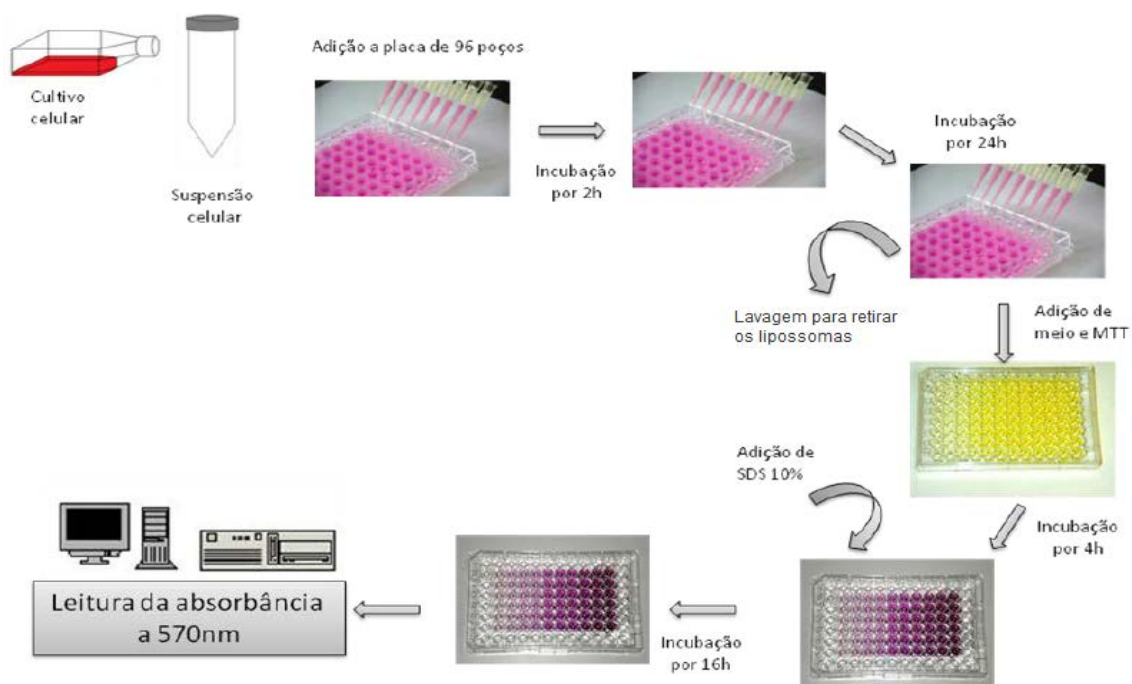
procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição sob o número 458.230 após a submissão na Plataforma Brasil (**ANEXO I**). Como descrito anteriormente, componentes presentes no soro promovem a opsonização das vesículas lipossomais e podem interferir na interação dos lipossomas com as células do SFM e conseqüentemente na viabilidade celular. Assim, 1×10^5 células/poço foram adicionadas em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça) e mantidas por quatro horas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO₂ para adesão das células ao fundo do poço. Após este período, os poços foram lavados com 200 µL de PBS estéril para retirar as células que não aderiram e, em seguida, foram adicionados 50 µL de DMEM contendo 10% SFB em todos os poços. Logo depois, os macrófagos foram tratados com as concentrações de 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL de cada formulação lipossomal e 0,1562 µg/mL, 0,3125 µg/mL, 0,625 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL de TE livre. Foram acrescentados 5 µL de soro humano fresco ou de PBS aos poços e o volume final completado para 100 µL com DMEM a 10% SFB. As placas foram incubadas por um período de 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Afim 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 CO₂. 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 como 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 570 nm. 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) (LII et al., 2009). Assim, a viabilidade celular foi estimada pela relação entre a absorbância das amostras testes e do controle. Os testes foram feitos em triplicata por duas vezes (n=6), em dias diferentes e

mesmas condições experimentais. O esquema resumido do ensaio de viabilidade celular encontra-se na **Figura 7**:

Figura 7: Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular.

Fonte: OLIVEIRA, 2010; BORGES, 2012.



4.4- Produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1

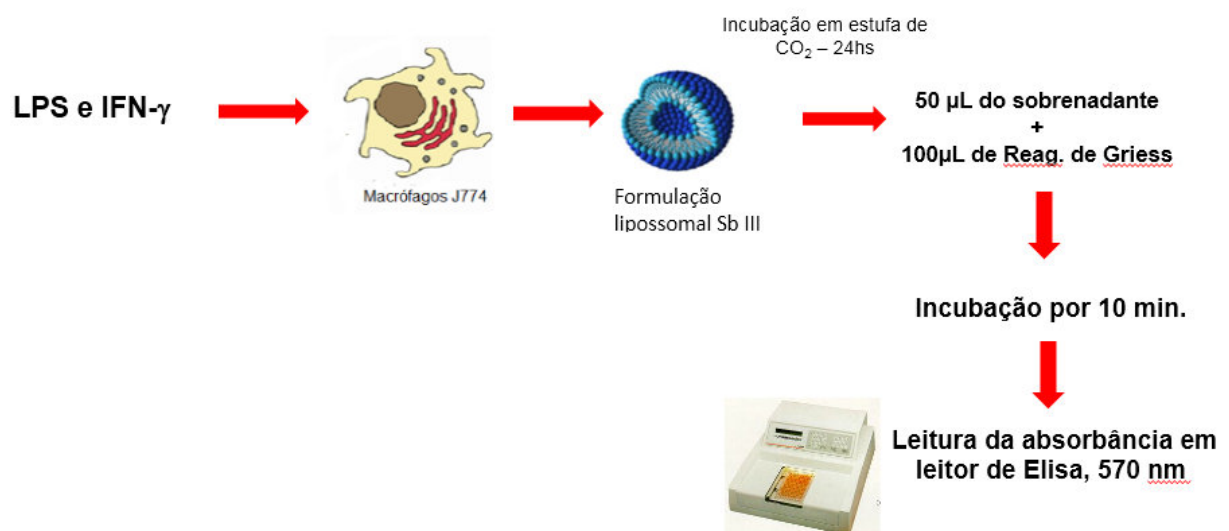
A produção de óxido nítrico foi avaliada pela quantificação de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de cultura de células J774 após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* 026:B6 (código: L4391, Sigma-Aldrich, Brasil) e IFN- γ (Recombinant Mouse IFN gamma, CF (100 UG), 485-MI- 100/CF, R&D Systems) pela reação com o reagente de Griess (GREEN et al., 1982; VERMA, N et al., 2010). Para a realização da dosagem de óxido nítrico, 1×10^6 células foram adicionadas a placas de 24 poços que foram incubadas por 2 horas em estufa umidificada a 37°C , 5% de CO_2 . 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 concentrações testadas de 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e

50 µg/mL das quatro formulações lipossomais e concentrações de 0,1562 µg/mL, 0,3125 µg/mL, 0,625 µg/mL e 1,25 µg/mL de TE livre. Foram acrescentados 5 µL de soro humano fresco ou de PBS aos poços e o volume final completado para 200 µL com DMEM a 10% SFB. A seguir, as placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Após a incubação, o sobrenadante das culturas de células foi coletado para a dosagem de NO e parte congelado para posterior dosagem de citocinas. Para a dosagem de NO, foram adicionados em placa de 48 poços, 50 µL dos sobrenadantes celulares a cada poço e 100 uL 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 (0-20 µM) de nitrito de sódio (NaNO₂) em meio DMEM 10% SFB. O esquema resumido do teste de dosagem de NO encontra-se na **Figura 8**:

Figura 8: Representação esquemática da dosagem de óxido nítrico.

Fonte: Adaptado de COSTA, 2015.



4.5- Cepa de *Leishmania infantum*

Para a realização desse trabalho, utilizou-se a cepa OP46 (MCAN/BR/2008/OP46), na passagem 4 (P4), isolada a partir de um cão sintomático de área endêmica da região da cidade de Governador Valadares/MG, posteriormente reisolada em hamster e caracterizada por *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) como *Leishmania (Leishmania) infantum*. A cepa foi gentilmente cedida pelo Dr. Alexandre Reis e Dr. Rodrigo Dian do Laboratório de Imunopatologia do NUPEB – Universidade Federal de Ouro Preto.

4.6 - Manutenção da cepa OP46 e curva de crescimento

Com o objetivo de manter a cepa OP46, os parasitos foram cultivados em *Grace Insect Medium* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – LGC, Cotia, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) 100U/mL de penicilina G (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), pH 6,5 (**Grace 10% SFB**), à temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Para a obtenção da curva de crescimento da cepa OP46, iniciou-se nova cultura com 1×10^5 parasitos/mL, mantidas as mesmas condições anteriores, e esta foi quantificada diariamente, em câmara de Neubauer após diluição em formalina 4% pelo período de 10 dias.

4.7- Animais experimentais

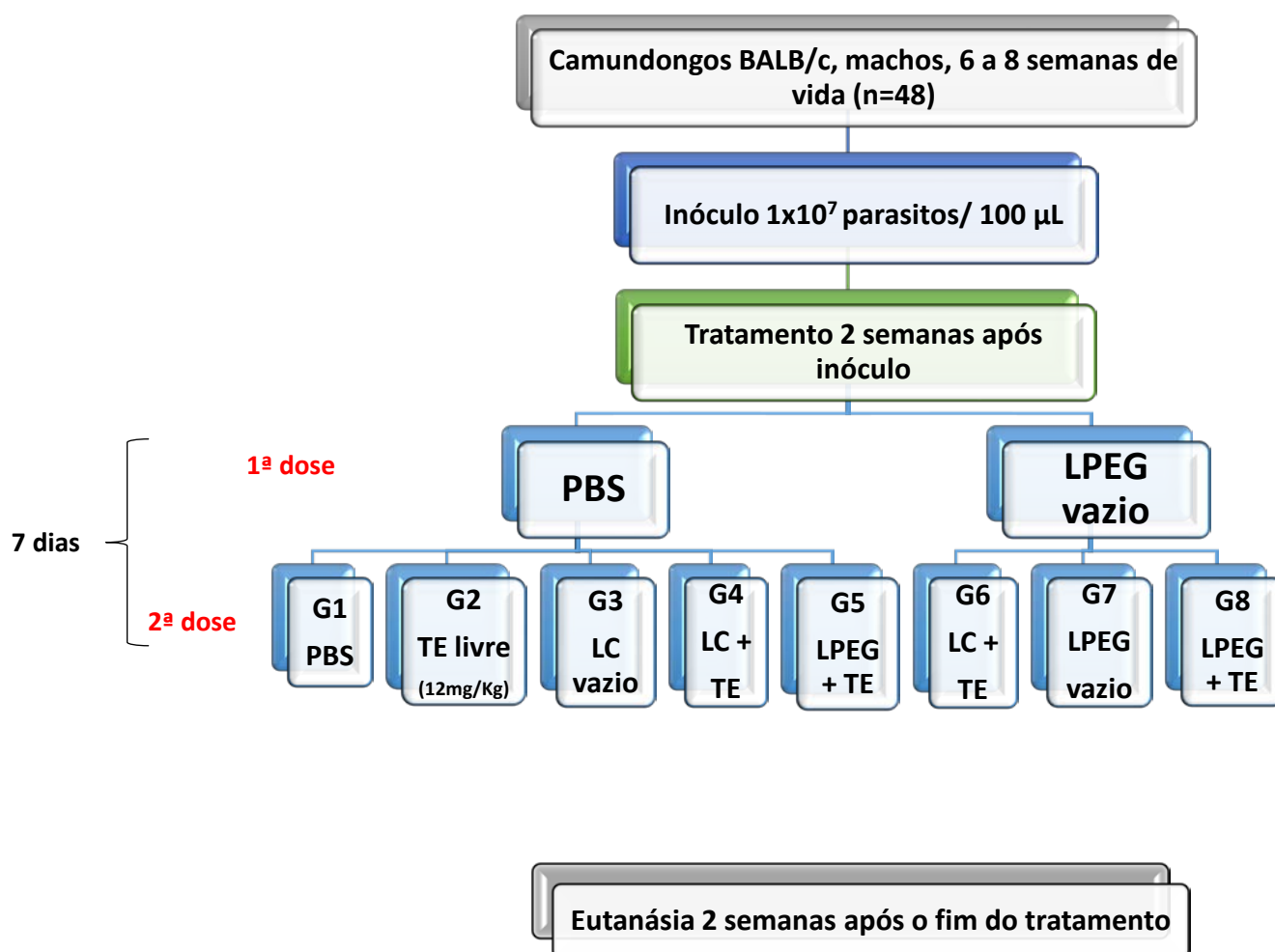
Foram utilizados 48 camundongos machos isogênicos da linhagem BALB/c, com idade entre 6 e 8 semanas de vida e peso médio de 30 gramas. Esses animais foram adquiridos e mantidos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Após a inoculação experimental (inóculo de 1×10^7 parasitos) os animais foram mantidos no setor de experimentação em isogênicos, alojados 4 a 4 em estantes ventiladas, mantidos em temperatura entre 21 e 25°C em ciclo de claro e escuro e água e ração *ad libitum*. Nesse trabalho, adotou-se a via intravenosa (IV) pela veia da cauda para o tratamento pelo fácil manuseio dos animais em experimentação e pelo fármaco/formulação ser administrado diretamente na corrente sanguínea do animal, evitando, por exemplo, dificuldades de absorção pelo sistema linfático, como pode ocorrer com o tratamento pela via intraperitoneal. O início do tratamento com as formulações lipossomais se deu duas semanas após o

inóculo a eutanásia duas semanas após o fim do tratamento (cinco semanas após a infecção). A realização desta etapa do trabalho deu-se após aprovação pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, protocolo n° 039/2013 (ANEXO II).

4.8- Delineamento experimental

Para avaliar o efeito do fenômeno ABC sobre o direcionamento dos lipossomas e sobre a carga parasitária dos animais, foi feito o seguinte protocolo de tratamento (Figura 9):

Figura 9: Protocolo de tratamento de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum*.



Legenda:
 TE = tártaro emético
 LC = lipossoma convencional
 LPEG = lipossoma peguilado

4.9- Avaliação do efeito do tratamento sobre os parâmetros hematológicos dos camundongos infectados

Após a eutanásia, foram coletadas amostras de sangue dos camundongos, através da artéria abdominal e armazenadas em microtubos contendo anticoagulante EDTA. Os parâmetros hematológicos de interesse foram avaliados no aparelho BC 2800 Vet (Mindray) no Laboratório de Imunopatologia do NUPEB/UFOP.

4.10- Avaliação do efeito do tratamento sobre a função hepática e renal dos camundongos infectados

Após a eutanásia, o sangue dos animais foi coletado através da artéria abdominal, armazenado em microtubos na ausência de anticoagulante e, após a retração do coágulo, processado em centrífuga para eppendorf a 700 rpm durante 10 min. O soro foi separado e feito o congelamento a -20°C para posteriores análises bioquímicas no aparelho SBA-200 no Laboratório de Imunoparasitologia do NUPEB/UFOP. Os reagentes utilizados foram cedidos pela *Bioclin – Quibasa*, através do programa “Bioclin nos Laboratórios Científicos”. Foram realizados testes de avaliação da função renal: creatinina; e da função hepática: aspartato cetoglutarato aminotransferase (AST ou TGO) e alanina cetoglutarato aminotransferase (ALT ou TGP).

4.11- Obtenção de células do baço dos camundongos e dosagens de citocinas

Após a eutanásia, as células do baço foram processadas como descrito anteriormente (MARQUES-DA-SILVA 2005). Um fragmento do baço de cada animal de cada grupo foi retirado e triturado e o macerado foi centrifugado. O pellet contendo as células obtidas foi tratado com uma solução a 1% de NH₄Cl para lisar as hemácias. As células do baço foram cultivadas em placa de 48 poços na concentração de 2,5 x 10⁶ células em 500 microlitros de DMEM pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 25 mM de HEPES, 50 µM de 2-mercaptoetanol e 20 microgramas/mL de gamicina (DMEM 10% SFB, pH 7,2). Essas células foram estimuladas com antígeno particulado de *L. infantum* (50 microgramas/poço) e as placas incubadas em estufa a 37° C com 5% de CO₂. Como controle foram utilizadas células do baço sem estímulo com antígeno. Os sobrenadantes foram coletados após 1 dia para

as dosagens das citocinas TNF- α e IL-10, que foram feitas com kits de ELISA comerciais (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir.

Em uma microplaca de 96 poços de poliestireno (TPP, Suíça), foi adicionado a cada poço 100 μ L de anticorpos de captura monoclonal anti TNF- α ou anti IL-10 em tampão fosfato-salino (PBS). As placas foram incubadas por 16 horas à temperatura ambiente para adequada adsorção dos anticorpos. Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (solução de lavagem). Em seguida, foi adicionado em cada poço 200 μ L da solução de bloqueio (PBS contendo 1% de soro fetal bovino) e as placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 1 h. Após esse período, as placas foram lavadas 4 vezes com a solução de lavagem. A cada poço foi adicionado 100 μ L dos sobrenadantes das culturas de células do baço anteriormente coletados. Aos poços padrão foi adicionado 100 μ L do padrão de citocinas (TNF- α ou IL-10) em diferentes concentrações. As placas foram então incubadas por 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes com a solução de lavagem e em seguida foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de detecção - anticorpo anticitocina (TNF- α ou IL-10) de camundongo marcado com biotina - em PBS contendo 0,05% de Tween-20 e 0,1% de soro fetal bovino (solução diluente). As placas foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente e lavadas 4 vezes com a solução de lavagem. Foi adicionado 100 μ L/poço do conjugado avidina-peroxidase em PBS contendo 0,05% de Tween-20 e 0,1% de solução diluente e as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas 7 vezes com solução de lavagem, adicionando-se em seguida 100 μ L/poço do substrato (10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina e 1,2 mM de H₂O₂). A reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de solução de SDS 1% a cada poço.

A absorbância foi lida a 490 nm em leitor de ELISA e a concentração das citocinas foi calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão estabelecida com concentrações conhecidas de cada padrão (TNF- α e IL-10). Na obtenção da curva padrão, o r² foi superior a 0,98.

4.12- Quantificação de parasito no fígado, baço e medula óssea

A quantificação de parasitos foi feita pela técnica de diluição limitante com algumas modificações (MARQUES-DA-SILVA et al., 2005). Cinco semanas após a inoculação do parasito, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. O fígado e o baço foram transferidos para um tubo estéril e pesados. Um fragmento pesado de cada órgão foi transferido para um tubo e pesado separadamente. Em seguida, os fragmentos foram transferidos, um de cada vez, para o macerador de órgãos contendo 2 mL de meio de lavagem estéril. Após maceração, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL (o procedimento de maceração foi repetido 2 vezes). Em seguida, o material foi centrifugado a $42 \times g/1\text{min}$, o sobrenadante obtido foi centrifugado a $1540 \times g/15\text{min}$ e o pellet- ressuspenso em 500 microlitros de *Grace's Insect Medium* 20% SFB, pH 6,8. O material obtido foi plaqueado em duplicata em placa de 96 poços estéril adicionando 160 μL nos primeiros poços e diluindo 1:5 nos poços subsequentes. A placa foi mantida em estufa a 23°C e examinada após 14 dias para a detecção de parasitos. Para a determinação da carga parasitária na medula óssea, retirou-se o fêmur e a tíbia da pata traseira de cada animal e imergiu-se os ossos em álcool etílico 70° (v:v) por 2 min, seguido por imersão em Meio de Lavagem. Foram cortadas as duas epífises e injetou-se Meio de Lavagem pelas extremidades, até completa remoção do tecido. Os materiais resultantes do processamento de baços, fragmentos de fígado e medula óssea foram centrifugados ($1540 \times g/ 10 \text{ min } 4^{\circ}\text{C}$) e o precipitado assim formado foi ressuspenso em 500 μL de meio Grace's completo. Plaqueou-se o material assim obtido, em duplicata, em placas de 96 poços de fundo chato, estéreis, seguindo diluições sucessivas 1:5 (v:v) em meio Grace's completo. A quantificação dos parasitos foi determinada em 14 dias, em estufa a 23°C , observando-se o crescimento dos parasitos ao longo da diluição (1:5 – v:v). Considerou-se como 3 parasitos/mg de tecido, a quantificação no primeiro poço da diluição. Os procedimentos adotados para a realização deste trabalho encontram-se em conformidade com os princípios éticos estabelecidos pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal.

4.13- Análises estatísticas

As análises estatísticas dos testes de viabilidade celular de células J774-A1 tratadas com as diferentes concentrações das formulações lipossomais foram realizadas com o auxílio do programa software GraphPad Prism 6, a partir da aplicação do teste de Kruskal Wallis.

As demais análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa software GraphPad Prism 6 e 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.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Caracterização físico-química das formulações lipossomais

As formulações lipossomais convencionais ou peguiladas contendo TE foram caracterizadas em triplicata quanto ao tamanho (dispersas em água), índice de polidispersão, potencial zeta (dispersas em NaCl 1mM) e porcentagem de encapsulação. Os valores encontrados são apresentados na **Tabela 1**:

Tabela 1: Características das formulações lipossomais quanto a tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e porcentagem de encapsulação.

Formulação	Composição (g/mL de formulação)				Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta	Porcentagem de encapsulação (%)
	DSPC	COL	DSPE-PEG	TE				
Lipossoma peguilado contendo TE	0,048	0,019	0,01	0,08	177,1 ± 0,9	0,07 ± 0,01	-2,59 ± 0,3	14
					184,8 ± 0,5	0,15 ± 0,07	-3,79 ± 0,3	14
					182,1 ± 1,3	0,09 ± 0,01	-3,59 ± 0,9	13
Lipossoma peguilado vazio	0,048	0,019	0,01	-	191,6 ± 1,6	0,06 ± 0,01	-3,42 ± 0,8	-
					188,9 ± 1,79	0,07 ± 0,01	-4,87 ± 0,9	
					180,4 ± 1,0	0,087 ± 0,04	-5,82 ± 2,1	
Lipossoma convencional contendo TE	0,048	0,019	-	0,08	197,3 ± 1,5	0,09 ± 0,03	-17,2 ± 0,7	14
					207,6 ± 1,8	0,14 ± 0,04	-12,9 ± 1,7	13
					206,1 ± 0,6	0,11 ± 0,03	-13,8 ± 0,8	13,5
Lipossoma convencional vazio	0,048	0,019	-	-	207,3±0,4	0,09±0,01	-12,7 ± 0,8	-
					219,8 ± 1,2	0,17 ± 0,01	-11,4 ± 0,2	
					211,7 ± 0,5	0,13 ± 0,03	-10,2 ± 0,9	

Os resultados acima mostram que houve homogeneidade de tamanho das partículas, indicada pelo baixo índice de polidispersão obtido após a extrusão. Os índices de polidispersão encontraram-se abaixo de 0,3, o que caracteriza as amostras como monodispersas (HUNTER; FRISKEN, 1998). Os valores obtidos indicam que a extrusão da formulação de lipossomas multilamelares através de membrana de policarbonato de 0,2 µm sobre pressão 250 psi/60°C pode ser considerada como uma técnica confiável para a calibração do tamanho dos lipossomas.

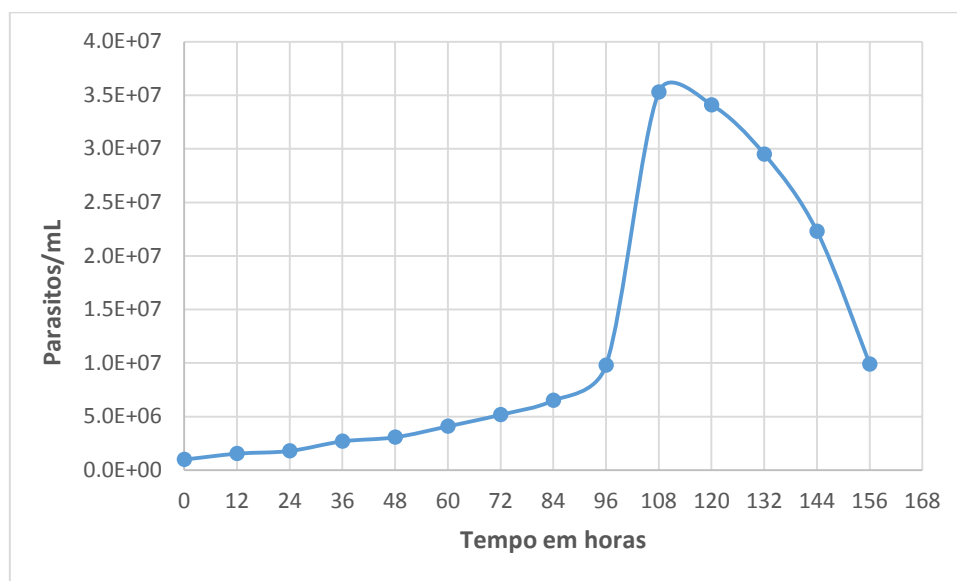
As médias das porcentagens de encapsulação foram de 13,6% para o lipossoma peguilado contendo TE e de 13,5% para o lipossoma convencional contendo TE. Frézard e Demicheli (2011) verificaram que a eficiência de encapsulação pode variar de 8 a 50 % no método de preparação de lipossomas contendo antimônio. De fato, a eficiência de encapsulação pode variar dependendo do tamanho dos lipossomas, do peso molecular das moléculas encapsuladas, composição lipídica das vesículas e procedimento de preparação dessas (MONNARD; OBERHOLZER; LUISI, 1997). Resultados semelhantes de porcentagens de encapsulação foram encontrados por Licio (2013) que estudou as mesmas formulações contendo TE e obteve $14,86 \pm 0,28$ para os lipossomas convencionais contendo TE e $13,78 \pm 0,02$ para os lipossomas peguilados contendo TE.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MOSQUEIRA et al., 2000). As formulações lipossomais peguiladas reduziram, em módulo, os valores de potencial zeta em relação às formulações convencionais. Esta redução no potencial zeta das nanopartículas peguiladas é amplamente descrita na literatura e provavelmente ocorreu devido ao mascaramento dos grupos carboxílicos terminais do DSPC pelas cadeias de PEG, assim como já é descrito que ocorre com as cadeias de PLA (ácido poliláctico) (AVGOUSTAKIS, 2004).

5.2- Curva de crescimento da cepa OP46

Para a utilização da cepa OP46 de *L. infantum* na realização deste trabalho, fez-se necessário a realização de uma curva de crescimento do parasito. Esta cepa, após seu isolamento e caracterização, foi mantida em meio Grace's 10% de SFB no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) - Cipharma – Universidade Federal de Ouro Preto. A **Figura 10** representa as sucessivas contagens de parasitos em câmara de Neubauer, feitas de 12 em 12 horas pós-diluição suficiente para a realização de contagem segura. Verificou-se que a fase estacionária iniciava-se no quinto dia para os parasitos da cepa OP46 cultivados na concentração de 1×10^5 parasitos/mL em meio Grace's 10% SFB.

Figura 10: Curva de crescimento *in vitro* dos parasitos da cepa OP46 de *Leishmania infantum* cultivada em meio Grace's 10% SFB.



5.3- Viabilidade de células J774-A1 tratadas com as formulações lipossomais ou com TE livre

Para avaliar o efeito do TE, livre ou na forma lipossomal, sobre a produção de NO pelos macrófagos J774-A1, primeiro foi feito o teste de MTT para determinar uma concentração lipossomal ou de fármaco livre que não fosse tóxica para a população de células em cultura. Nesse ensaio, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações das formulações lipossomais (de 10 a 500 $\mu\text{g/mL}$) e do TE livre (doses de 0,1562 a 5 $\mu\text{g/mL}$) sobre a viabilidade celular de macrófagos J774-A1. 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 e interferir na captura pelos macrófagos.

Observou-se que quando as células foram incubadas com as formulações lipossomais que continham o TE (lipossoma peguilado contendo TE e lipossoma convencional contendo TE), não se observou citotoxicidade até a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ na ausência de soro fresco humano, situando-se os valores de viabilidade acima de 90%. Já na presença de soro humano fresco, na mesma concentração (50 $\mu\text{g/mL}$), a viabilidade celular reduziu para valores abaixo de 90% e obteve-se viabilidade celular

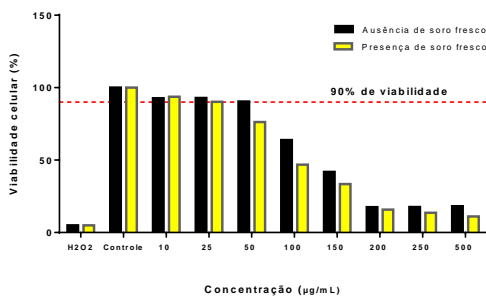
acima de 90% até a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (**Figuras 11-A e 11-C**). Para as formulações lipossomais vazias (lipossoma peguilado vazio e lipossoma convencional vazio), a viabilidade celular manteve-se até a concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$, tanto na ausência quanto na presença de soro humano fresco. Porém, nas concentrações maiores, a presença de soro humano fresco reduziu bastante a viabilidade celular para valores muito abaixo de 90% (**Figuras 11-B e 11-D**). De fato, vários autores já relataram que as proteínas do soro podem interferir na interação com os macrófagos, facilitando o processo de fagocitose das formulações, o que pode interferir na viabilidade dos macrófagos (LIU, D, 1997; BORGES, 2011; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013).

Foi avaliado também o efeito do TE livre sobre a viabilidade de macrófagos J774-A1. Observou-se que na ausência de soro humano fresco, as células foram viáveis até a concentração de 1,25 $\mu\text{g/mL}$, e na presença do soro, a viabilidade celular manteve-se acima de 90% na concentração de 0,625 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 11-E**).

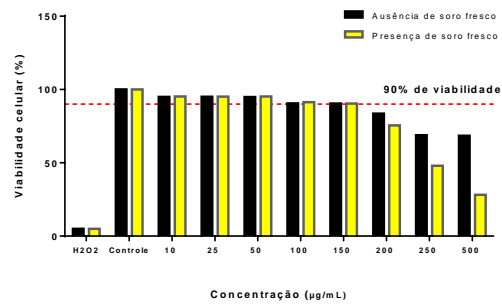
Como a porcentagem de encapsulação das formulações lipossomais contendo o fármaco foi em torno de 13,5% e estas foram preparadas inicialmente com uma solução de TE de 80 mg/mL , a concentração de fármaco final nas formulações foi em torno de 16,8 mg/mL (16800 $\mu\text{g/mL}$). Para as formulações contendo o fármaco, observou-se que a viabilidade celular foi mantida até a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e para o fármaco na forma livre até 1,25 $\mu\text{g/mL}$. Isso demonstra que o fármaco em sua forma livre apresenta citotoxicidade muito maior do que quando encapsulado na forma lipossomal. Acreditamos que no tratamento com a formulação lipossomal o fármaco seja direcionado diretamente aos fagolisossomas, local onde se encontra a *Leishmania*, enquanto na forma livre permanece no citoplasma até entrar nos fagolisossomas, e que isso seria responsável pela morte das células

Figura 11: Avaliação do efeito das formulações lipossomais e do TE livre sobre a viabilidade de macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano. Macrófagos J774-A1 (1×10^5 células/poço) foram incubados com diferentes concentrações das formulações lipossomais, na ausência e presença de soro fresco humano. Após 24 horas de incubação, foi realizado o teste de MTT para avaliação da viabilidade celular. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado como indutor de morte celular e controle de morte. Os dados foram comparados ao controle, células sem tratamento, correspondendo a 100% de viabilidade. Foram consideradas viáveis as células que apresentaram valores de porcentagem iguais ou maiores a 90% de viabilidade. Os resultados foram expressos como a média das porcentagens de viabilidade celular (n=6). (A) Lipossomas peguilados contendo TE. (B) Lipossomas peguilados vazios. (C) Lipossomas convencionais contendo TE. (D) Lipossomas convencionais vazios. (E) TE livre.

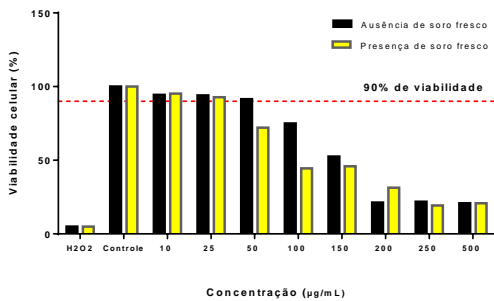
A



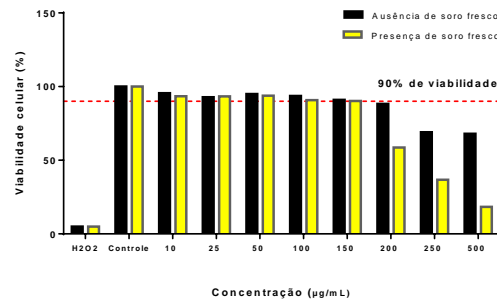
B



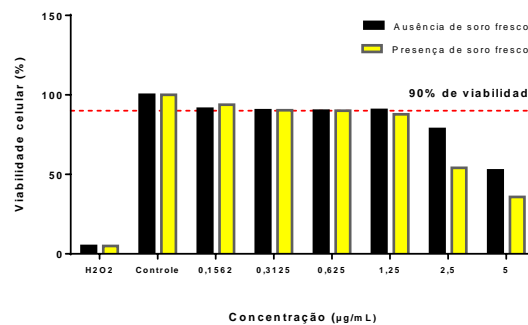
C



D



E



5.4- Efeito das formulações lipossomais sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades e altamente tóxica devido à presença de radical livre (elétron extra) que a torna um agente químico altamente reativo. Quando diluído, o NO tem uma meia vida de menos de 10 segundos devido a sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. O NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contém o grupo heme levando ao término de sua atividade biológica (SNYDER et al., 1997).

Uma das enzimas de síntese do NO é a iNOS (óxido nítrico sintase induzível), que não é expressa constitutivamente, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e/ou citocinas. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas que deveria ser tóxico para micróbios, parasitos ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

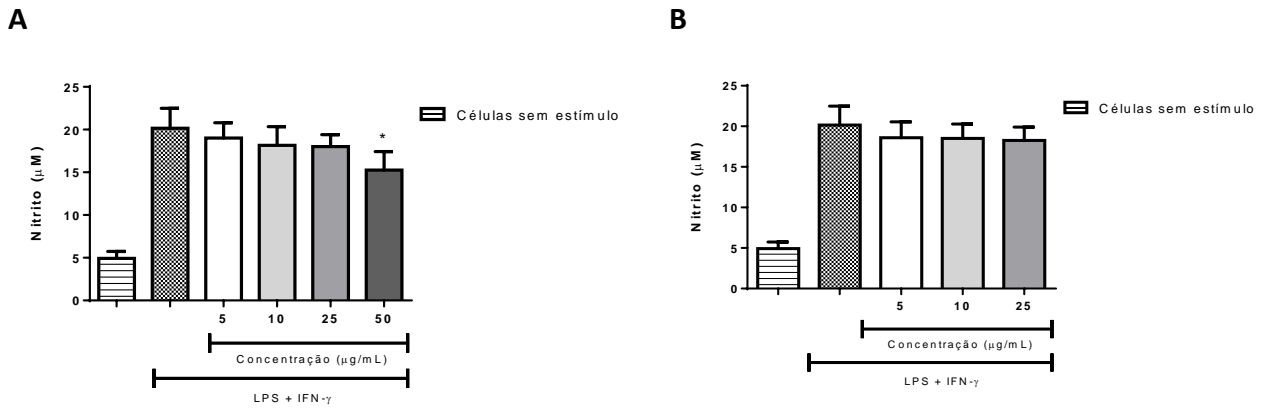
O óxido nítrico tem uma importância significativa no sistema imune humano, tendo uma ação tumoricida e antimicrobiana, atuando como um agente tóxico para organismos infecciosos (BOGDAM, 2000; TRIPATHI, 2007). Experiências realizadas em ratos que não possuíam a enzima iNOS permitiram concluir que estes eram incapazes de combater infecção por *Leishmania major*. Por outro lado, ratos selvagens (que possuíam a enzima iNOS) demonstraram grande eficiência no combate à infecção por estes parasitos (LIEW, 2007).

Para avaliar o efeito das formulações lipossomais sobre a produção de óxido nítrico, células J774-A1 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações dos lipossomas na presença ou ausência de estímulo (25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN- γ) e de soro fresco humano. A determinação da produção de NO no sobrenadante da cultura celular foi avaliada pelo método de Griess (Green *et al.*, 1982). A produção de óxido nítrico (detectada pela produção de nitrito) por macrófagos J774-A1 estimulados com LPS e IFN- γ e incubados com as diferentes concentrações lipossomais foi comparada com a produção de óxido nítrico pelos macrófagos estimulados apenas com LPS e IFN- γ .

O estímulo das células (IFN- γ + LPS) provocou produção significativa de óxido nítrico. Na ausência de estímulo, as células J774-A1 não produziram NO. As concentrações testadas das formulações lipossomais foram determinadas de acordo com as porcentagens de viabilidade celular encontradas no teste de MTT, de forma que somente as concentrações nas quais a viabilidade celular estava acima de 90% foram utilizadas no teste de NO. Dessa forma, para as formulações contendo o fármaco, a produção de NO foi avaliada nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ na ausência de soro fresco humano, e nas concentrações de 5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$ na presença de soro fresco humano; para as formulações vazias as concentrações testadas foram de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ na ausência e presença de soro fresco humano; e para o TE livre as concentrações testadas foram de 0,1562; 0,3125; 0,625 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ na ausência de soro fresco humano e de 0,1562; 0,3125 e 0,625 $\mu\text{g/mL}$ na presença de soro fresco humano.

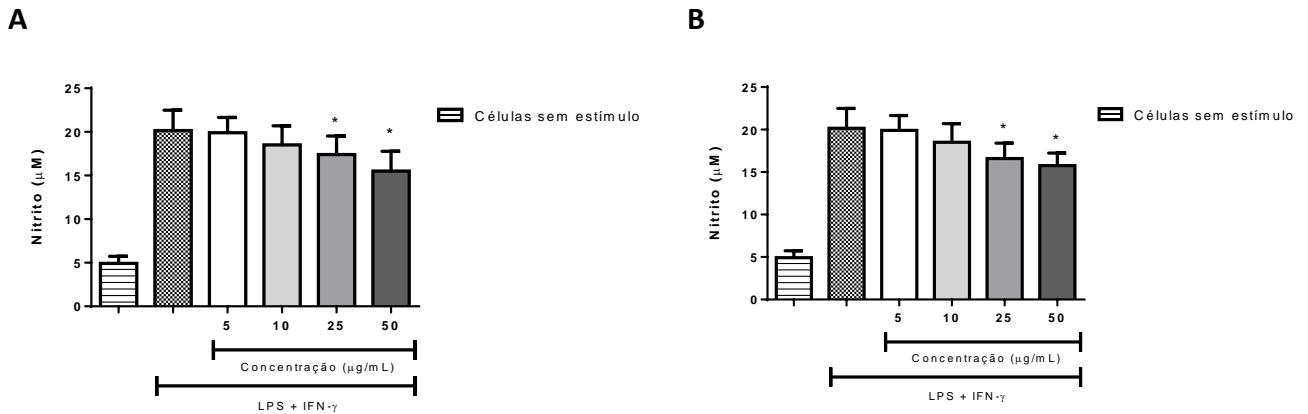
Os lipossomas peguilados contendo TE provocaram uma redução significativa na produção de NO pelas células J774-A1 apenas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, na ausência de soro fresco humano, e não apresentaram diferença na produção de NO em relação ao controle nas demais concentrações testadas. Na presença de soro fresco humano, nenhuma das concentrações testadas tiveram efeito na produção de NO (**Figuras 12-A e 12-B**).

Figura 12: Avaliação do efeito dos lipossomas peguilados contendo TE sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano. Células J774-A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN- γ em placas de 48 poços e tratadas com diferentes concentrações de lipossomas peguilados contendo TE por 24 h, na ausência ou presença de soro fresco humano. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO na forma de nitrato (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média \pm d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 em relação às células J774.A1 estimuladas e não tratadas (n=12). Tratamento com: (A) Lipossomas peguilados contendo TE na ausência de soro fresco humano. (B) Lipossomas peguilados contendo TE na presença de soro fresco humano.



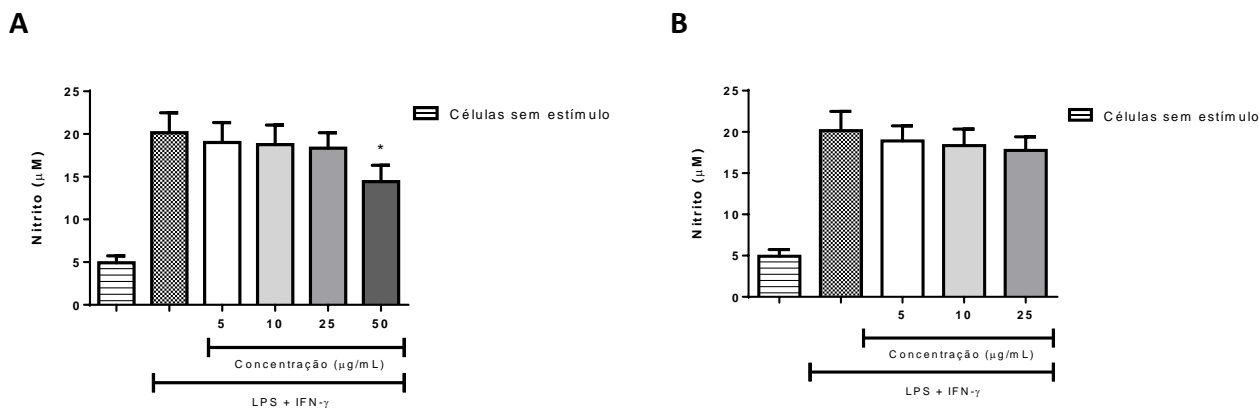
De acordo com as **Figuras 13-A e 13-B** é possível observar que os lipossomas peguilados vazios reduziram significativamente a produção de NO pelas células estimuladas, na ausência e presença de soro fresco humano, nas maiores concentrações testadas (25 e 50 µg/mL) e não tiveram efeito na redução da produção de NO nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Esses dados sugerem que a redução da produção de NO é devido aos constituintes das formulações lipossomais e não ao fármaco e que o efeito do TE sobre o parasito não é pela ativação da produção de NO.

Figura 13: Avaliação do efeito dos lipossomas peguילים vazios sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano. Células J774-A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN- γ em placas de 48 poços tratadas com diferentes concentrações de lipossomas peguילים vazios por 24 h, na ausência ou presença de soro fresco humano. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO na forma de nitrito (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média \pm d.p. (desvio padrão). *indica $P < 0,05$ em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas (n=12). Tratamento com: (A) Lipossomas peguילים vazios na ausência de soro fresco humano. (B) Lipossomas peguילים vazios na presença de soro humano fresco.



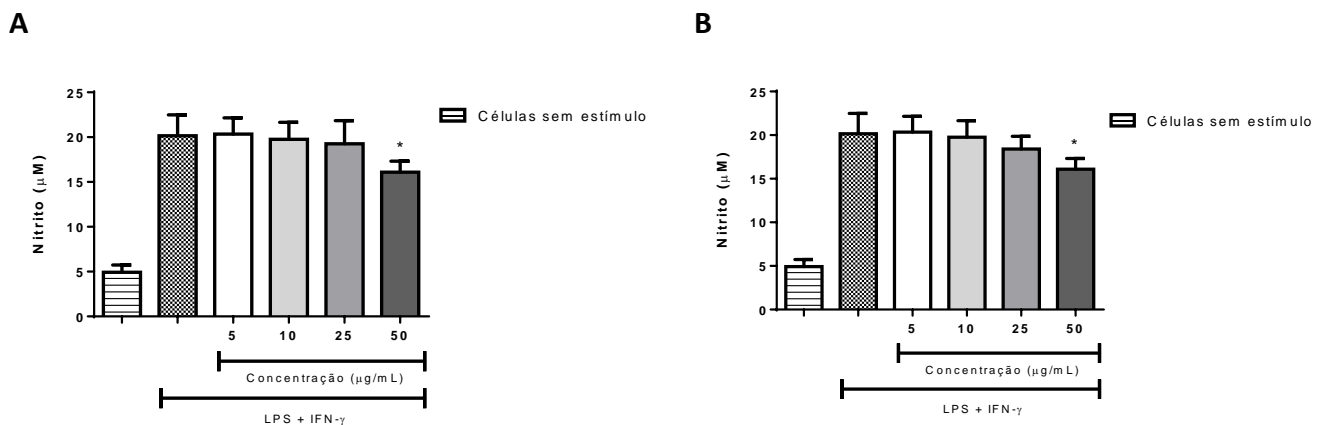
Os lipossomas convencionais contendo TE induziram uma redução significativa na produção de NO pelas células J774-A1 apenas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, na ausência de soro fresco humano, e não apresentaram diferença na produção de NO em relação ao controle nas demais concentrações testadas. Na presença de soro fresco humano, nenhuma das concentrações testadas teve efeito na produção de NO (**Figuras 14-A e 14-B**).

Figura 14: Avaliação do efeito dos lipossomas convencionais contendo TE sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano. Células J774-A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN- γ em placas de 48 poços e tratadas com diferentes concentrações de lipossomas convencionais contendo TE por 24 h, na ausência ou presença de soro fresco humano. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO na forma de nitrito (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média \pm d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas (n=12). Tratamento com: (A) Lipossomas convencionais contendo TE na ausência de soro fresco humano. (B) Lipossomas convencionais contendo TE na presença de soro fresco humano.



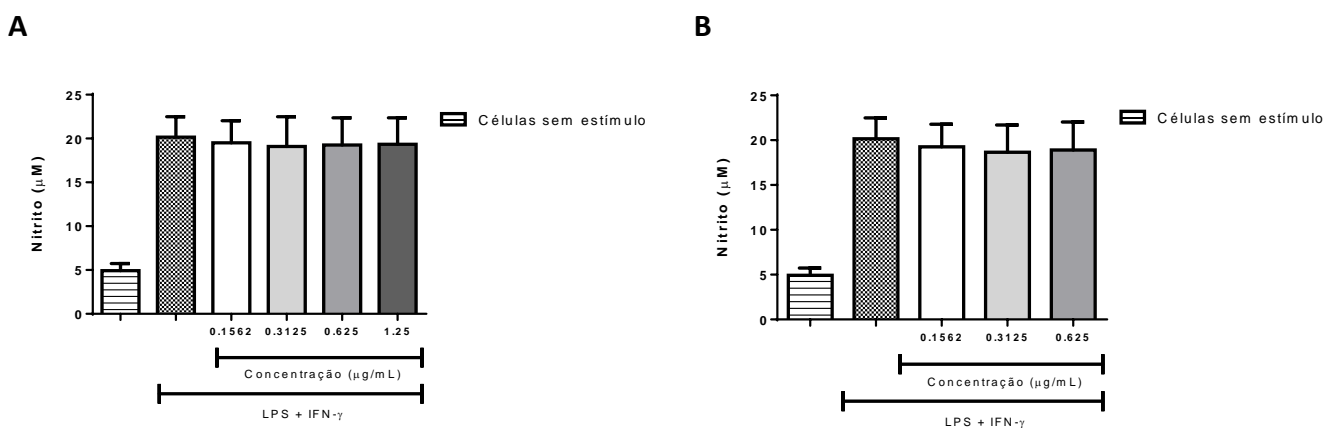
Os lipossomas convencionais vazios induziram uma redução significativa na produção de NO pelas células J774-A1 apenas na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tanto na ausência quanto na presença de soro fresco humano, e não apresentaram diferença na produção de NO em relação ao controle nas demais concentrações testadas (**Figuras 15-A e 15-B**).

Figura 15: Avaliação do efeito dos lipossomas convencionais vazios sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano. Células J774-A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN- γ em placas de 48 poços e tratadas com diferentes concentrações de lipossomas convencionais vazios por 24 h, na ausência ou presença de soro fresco humano. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO na forma de nitrato (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média \pm d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas (n=12). Tratamento com: (A) Lipossomas convencionais vazios na ausência de soro fresco humano. (B) Lipossomas convencionais vazios na presença de soro fresco humano.



O TE livre não teve nenhum efeito sobre a produção de NO em relação ao controle, tanto na ausência quanto na presença de soro fresco humano, em nenhuma das concentrações testadas (**Figuras 16-A e 16-B**).

Figura 16: Avaliação do efeito do TE livre sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774-A1 na ausência e presença de soro fresco humano. Células J774-A1 foram estimuladas com 25 ng/mL de LPS e 25 U/mL de IFN- γ em placas de 48 poços e tratadas com diferentes concentrações de TE livre por 24 h, na ausência ou presença de soro fresco humano. As células cultivadas somente com meio de cultura correspondem à produção basal de NO na forma de nitrito (células sem estímulo). Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão apresentados como média \pm d.p. (desvio padrão). *P < 0,05 em relação às células J774.A1 não tratadas e estimuladas (n=12). Tratamento com: (A) TE livre na ausência de soro fresco humano. (B) TE livre na presença de soro fresco humano.



O efeito de redução da produção de óxido nítrico ocorreu na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ nas formulações que contêm o TE, na ausência de soro fresco humano e na formulação lipossomal convencional vazia tanta na presença quanto na ausência de soro. A formulação lipossomal peguilada vazia apresentou redução de produção de NO nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, tanto na ausência quanto na presença de soro. Nenhuma concentração testada de TE livre apresentou diferença significativa de produção de NO em relação ao controle, o que sugere que esse efeito não ocorreu devido ao fármaco e sim devido aos demais constituintes das formulações lipossomais. A presença de soro fresco humano não alterou o perfil de produção de NO por células J774-A1 pelo tratamento com as formulações lipossomais.

A destruição das formas amastigotas de *Leishmania* e o controle da infecção são dependentes da produção de NO por macrófagos. Por outro lado, níveis baixos de NO relacionam-se à resistência parasitária e uma dificuldade em controlar a infecção pelo organismo (BACELLAR & CARVALHO, 2005; LIESE et al., 2008; BANERJEE et al., 2011). Como não se observou aumento na produção de NO após tratamento com as formulações lipossomais ou TE livre, esses dados sugerem que a ação leishmanicida do TE se deva ao seu efeito direto sobre o parasito e não através da produção de mediadores tóxicos.

5.5- Avaliações bioquímicas da função hepática e renal dos camundongos infectados

A evolução dos casos de leishmaniose visceral pode levar a comprometimento hepático em modelo cão estudado por alguns pesquisadores (GIUNCHETTI et al., 2007; MELO et al., 2009). Algumas das reações adversas causadas pelos antimoniais no homem são o comprometimento renal com elevação da ureia e creatinina, hepatotoxicidade com elevação das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e pancreatite com elevação da amilase e lipase (DELGADO et al., 1999; BRASIL, 2007). A excreção dos antimoniais é renal e pacientes que fazem uso desses medicamentos devem ter sua função renal monitorada, principalmente crianças e pacientes que já apresentam algum comprometimento renal (CRUZ et al., 2007). Dessa forma, foram feitas dosagens bioquímicas da função hepática e renal para avaliar se o tratamento teria algum efeito nos animais infectados.

Para a avaliação da função hepática, foram dosadas as enzimas AST e ALT e os resultados obtidos foram comparados com valores de referência de concentrações séricas de AST e ALT de $219,15 \pm 19,52$ U/L e $102,55 \pm 2,89$ U/L, respectivamente, estabelecidos por dosagens bioquímicas em BALB/c sadios, realizadas por nosso grupo de pesquisa, nas mesmas condições dos ensaios nas amostras dos grupos experimentais.

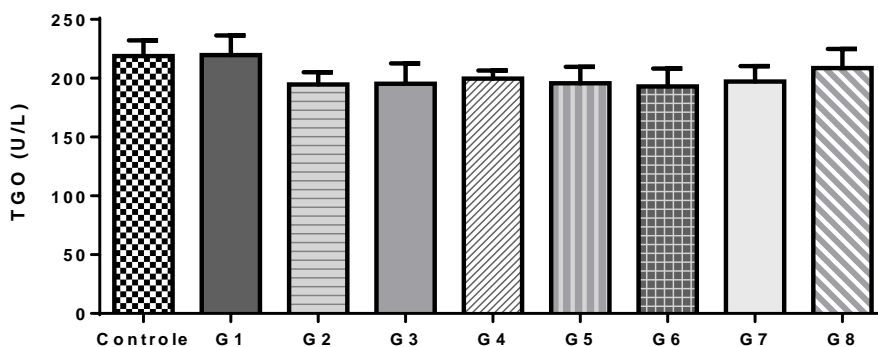
A alaninacetoglutarato aminotransferase (TGP ou ALT) e a asparto cetoglutarato aminotransferase (TGO ou AST) são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades nos hepatócitos. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST está presente nas mitocôndrias. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação. Em dano hepatocelular leve, a forma predominante no soro é a citoplasmática, e em lesões graves, há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (MOTTA, 2003). A ALT é utilizada para diagnóstico das enfermidades hepatobiliares agudas, já a AST eleva-se em casos de necrose cardíaca. O predomínio da ALT indica somente uma alteração na membrana, enquanto o predomínio da AST revela lesão das organelas citoplasmáticas (ALARCÓN-CORREDOR et al., 2000).

Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de TGO e TGP no grupo infectado e não tratado (G1), o que indica que a infecção com a cepa OP46 de *Leishmania infantum* não provocou alteração destas enzimas hepáticas. Além disso, não houve também diferenças significativas entre os grupos experimentais e os animais não

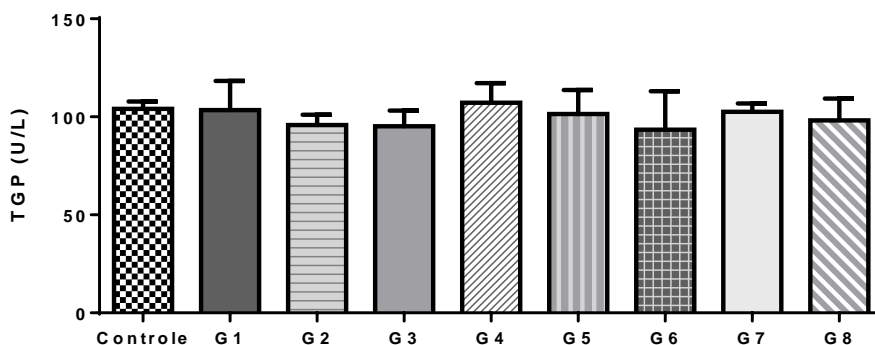
tratados ou os animais do grupo controle (animais sadios nas mesmas condições dos ensaios nas amostras dos grupos experimentais). Esses dados mostram que a administração dos tratamentos propostos não produziu alterações significativas nos parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*.

Figura 17: Avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. Após a eutanásia, o sangue dos animais foi coletado através da artéria abdominal, armazenado em microtubos na ausência de anticoagulante e, após a retração do coágulo, processado em centrífuga para eppendorf a 700 rpm durante 10 min. O soro foi separado e as dosagens de TGO e TGP foram feitas. (G1) Primeira dose PBS e não tratados (controle). (G2) Primeira dose PBS e tratados com TE livre (12 mg/kg). (G3) Primeira dose PBS e tratados com lipossoma convencional vazio. (G4) Primeira dose PBS e tratados com lipossoma convencional contendo TE. (G5) Primeira dose PBS e tratados com lipossoma peguilado contendo TE. (G6) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e tratados com lipossoma convencional contendo TE. (G7) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e tratados com lipossoma peguilado vazio. (G8) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e tratados com lipossoma peguilado contendo TE. (A) Concentração sérica de asparto cetogluturato aminotransferase (TGO). (B) Concentrações séricas de alanina cetogluturato aminotransferase (TGP). Concentração sérica de transaminases dada por U/L. Os resultados estão representados como mediana \pm diferença interquartil (n=5).

A



B

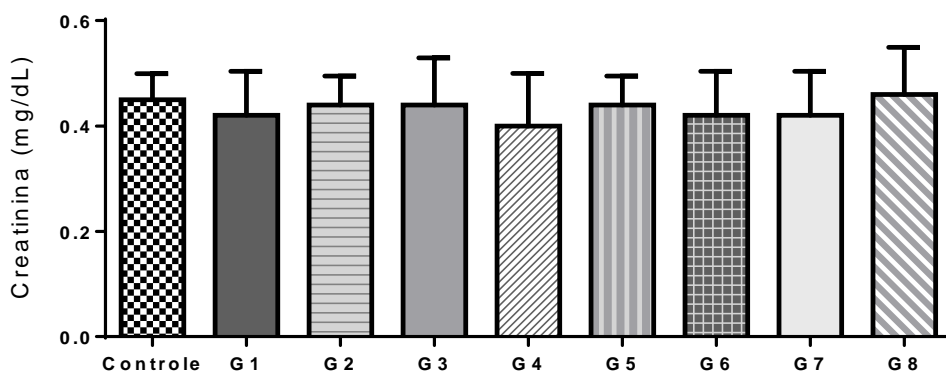


Para a avaliação da função renal, foi dosada creatinina sérica dos animais em experimentação e os resultados obtidos foram comparados com o valor de referência de creatinina sérica de $0,45 \pm 0,07$ mg/dL, estabelecido por dosagens bioquímicas em BALB/c sadios, realizadas por nosso grupo de pesquisa, nas mesmas condições dos ensaios nas amostras dos grupos experimentais.

A creatinina sérica é um biomarcador da taxa de filtração glomerular e tem papel no diagnóstico e monitoramento da doença renal. O valor elevado de creatinina no soro pode ser indicativo de problemas na perfusão renal e provável lesão renal (DALTON, 2011).

Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de creatinina sérica, parâmetro indicativo de toxicidade renal, entre os grupos experimentais e o controle (animais sadios nas mesmas condições dos ensaios nas amostras dos grupos experimentais).

Figura 18: Avaliação bioquímica da função renal de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. Após a eutanásia, o sangue dos animais foi coletado através da artéria abdominal, armazenado em microtubos na ausência de anticoagulante e, após a retração do coágulo, processado em centrífuga para eppendorf a 700 rpm durante 10 min. O soro foi separado e a dosagem de creatinina sérica foi feita. (G1) Primeira dose PBS e não tratados (controle). (G2) Primeira dose PBS e tratados com TE livre (12 mg/kg). (G3) Primeira dose PBS e tratados com lipossoma convencional vazio. (G4) Primeira dose PBS e tratados com lipossoma convencional contendo TE. (G5) Primeira dose PBS e tratados com lipossoma peguilado contendo TE. (G6) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e tratados com lipossoma convencional contendo TE. (G7) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e tratados com lipossoma peguilado vazio. (G8) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e tratados com lipossoma peguilado contendo TE. Concentração sérica de creatinina, dada por U/L. Os resultados estão representados como mediana \pm diferença interquartil (n=5).



5.6 – Avaliação dos parâmetros hematológicos dos camundongos infectados

Exposições crônicas ao antimônio ou compostos antimoniais podem conduzir a alterações dos parâmetros hematológicos em humanos (ATSDR, 1995). Alguns estudos traçaram o perfil hematológico da leishmaniose visceral no modelo cão e demonstraram diferenças estatísticas no número de hemácias e hematócrito devido à infecção (MEDEIROS et al., 2008; FREITAS et al., 2012). Assim, foi avaliado se o tratamento teria algum efeito nestes parâmetros dos camundongos infectados.

Os parâmetros hematológicos obtidos ao serem avaliadas as amostras sanguíneas dos camundongos infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes tratamentos encontram-se resumidos na **Tabela 2**.

Foram utilizados como controle dos parâmetros hematológicos valores obtidos através da dosagem do sangue de animais BALB/c sadios, realizada nas mesmas condições dos ensaios nas amostras dos grupos experimentais, situados em $8,6 \pm 0,78$ ($10^{12}/L$) para hemácia; $14,1 \pm 1,59$ (g/dL) para hemoglobina; $29,1 \pm 2,84$ (%) para hematócrito; $3,5 \pm 1,17$ para leucócito ($10^9/L$); e $278,4 \pm 21,17$ ($10^9/L$) para plaquetas.

Não foram observadas diferenças significativas após comparação entre os grupos (n=5).

Tabela 2: Avaliação dos parâmetros hematológicos dos camundongos infectados por *Leishmania infantum* submetidos a diferentes tratamentos.

	Hemácias ($10^{12}/L$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos ($10^9/L$)	Plaquetas ($10^9/L$)
Controle	$8,6 \pm 0,78$	$14,1 \pm 1,59$	$29,1 \pm 2,84$	$3,5 \pm 1,17$	$278,4 \pm 21,1$
G1	$8,15 \pm 0,63$	$13,7 \pm 1,68$	$29,86 \pm 1,53$	$2,94 \pm 0,4$	$253 \pm 15,3$
G2	$7,78 \pm 0,38$	$12,64 \pm 0,8$	$28,4 \pm 0,81$	$3,78 \pm 1,10$	$251,8 \pm 16,5$
G3	$8,32 \pm 0,34$	$13,12 \pm 0,98$	$29,68 \pm 1,4$	$2,94 \pm 0,18$	$248,2 \pm 19,2$
G4	$7,96 \pm 0,10$	$13,06 \pm 0,25$	$28,28 \pm 0,83$	$3,5 \pm 1,1$	$269,6 \pm 34,4$
G5	$7,95 \pm 0,30$	$12,22 \pm 1,27$	$28,88 \pm 2,03$	$3,3 \pm 0,30$	$279,6 \pm 18,6$
G6	$7,80 \pm 0,35$	$12,5 \pm 0,82$	$28,96 \pm 1,12$	$3,36 \pm 0,44$	$277,6 \pm 15,7$
G7	$7,57 \pm 0,32$	$12,24 \pm 0,36$	$29,02 \pm 0,82$	$2,9 \pm 0,46$	$252,4 \pm 9,3$
G8	$8,3 \pm 0,28$	$13,52 \pm 0,68$	$29,8 \pm 1,09$	$3,5 \pm 0,49$	$282,6 \pm 8,3$

5.7- Quantificação de citocinas das células do baço dos camundongos tratados com as formulações lipossomais

A avaliação da produção de IL-10 na leishmaniose é bastante importante, pois sendo uma citocina antiinflamatória, inibe a ação de IFN- γ e NO, que têm papel importante na eliminação do parasita e no controle da lesão. Esta citocina suprime muitas funções de células NK e de células T por inibir a apresentação de antígenos e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ . Muitos tipos celulares podem produzir IL-10 incluindo fagócitos, células dendríticas, células T e B e células NK. IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida especificamente por células CD4+Th2, porém, estudos posteriores mostraram que IL-10 pode ser secretada tanto por células Th2 quanto Th1 (TRINCHIERI, 2007).

Foi observada uma redução na produção de IL-10 pelas células do baço dos grupos tratados com TE livre ou formulações que continham TE (G2, G4, G5, G6 e G8) após estímulo com antígeno particulado de *Leishmania infantum* comparado às células do baço dos animais do grupo não tratado (G1) também estimuladas com antígeno (**Figura 19**). Por outro lado, não foram observadas diferenças nos níveis de produção de TNF- α pelas células do baço em nenhum dos grupos tratados em relação ao grupo controle (**Figura 20**).

Figura 19: Produção de IL-10 pelas células do baço dos camundongos. (PBS) Tampão fosfato. (TE) Tártaro emético. (LC vazio) Lipossoma convencional vazio. (LC + TE) Lipossoma convencional contendo tártaro emético. (LPEG + TE) Lipossoma peguilado contendo tártaro emético. (LPEG vazio) Lipossoma peguilado vazio. (G1) Primeira e 2ª dose com PBS (controle). (G2) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com tártaro emético livre (12 mg/kg). (G3) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional vazio. (G4) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tártaro emético. (G5) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma peguilado contendo tártaro emético. (G6) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tártaro emético. (G7) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguilado contendo tártaro emético. (G8) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguilado contendo tártaro emético. (ABC) Grupos em que houve indução do fenômeno ABC. (Ag. *L. infantum*) Células estimuladas com antígeno de *Leishmania infantum*. * diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a G1 – células sem estímulo. ** diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a G1 – Ag. *L. infantum*.

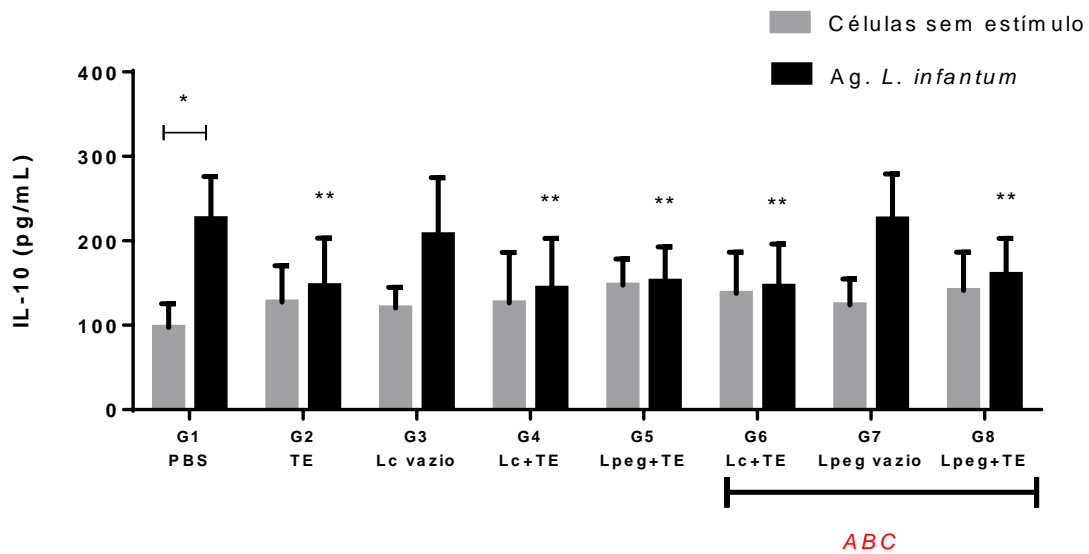
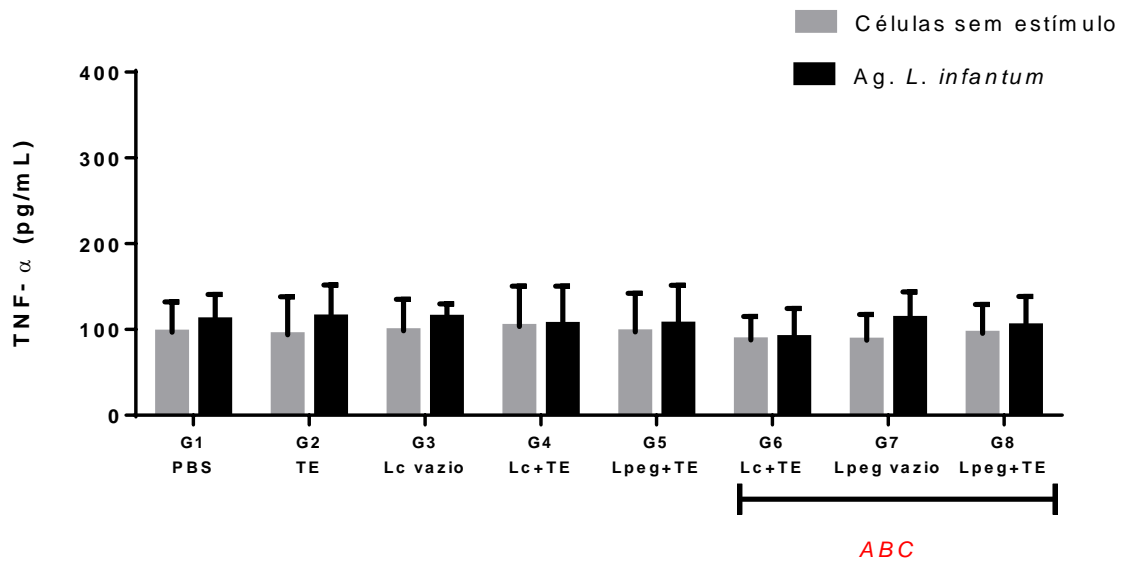


Figura 20: Produção de TNF- α pelas células do baço de camundongos tratados. (PBS) Tampão fosfato. (TE) Tártaro emético. (LC vazio) Lipossoma convencional vazio. (LC + TE) Lipossoma convencional contendo tártaro emético. (LPEG + TE) Lipossoma peguilado contendo tártaro emético. (LPEG vazio) Lipossoma peguilado vazio. (G1) Primeira e 2ª dose com PBS (controle). (G2) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com tártaro emético livre (12 mg/kg). (G3) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional vazio. (G4) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tártaro emético. (G5) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma peguilado contendo tártaro emético. (G6) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tártaro emético. (G7) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguilado vazio. (G8) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguilado contendo tártaro emético. (ABC) Grupos em que houve indução do fenômeno ABC. (Ag. *L. infantum*) Células estimuladas com antígeno de *Leishmania infantum*.



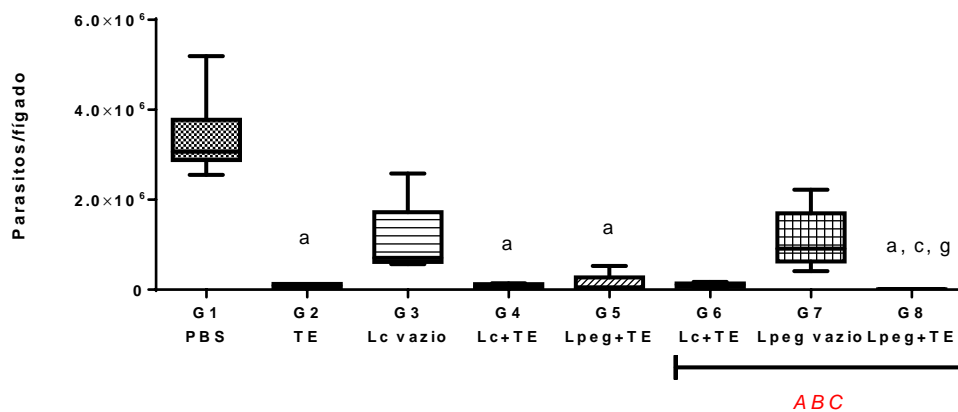
Sabe-se que o fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória que atua no recrutamento de leucócitos e na estimulação de fagócitos mononucleares para produção de óxido nítrico e de intermediários reativos de oxigênio (WILHELM et al., 2001). No entanto, a citocina IL-10 é considerada uma citocina imunossupressora e por isso apresenta importante propriedade anti-inflamatória. Essa citocina tem a capacidade de prevenir uma resposta imune excessiva através da inibição da apresentação de antígenos, da produção de NO e de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- γ e TNF- α (PRAKASH et al., 2006). Há estudos que mostram que pacientes com leishmaniose visceral produzem elevados níveis de IL-10 (FALEIRO et al., 2014). Dessa forma, sugere-se que a diminuição de IL-10 encontrada nos grupos tratados com TE ou com as formulações que continham TE se deu em função da ação de ativação dos macrófagos contra os parasitos do TE no baço dos animais. Os grupos tratados com as formulações vazias (G3 e G7) não apresentaram diferença na produção de IL-10, o que confirma que o efeito de redução desta citocina dos outros grupos se deu devido à ação do TE.

5.8- Carga parasitária de fígado, baço e medula óssea dos camundongos infectados

O efeito das formulações lipossomais foi testado *in vivo* em camundongos BALB/c, machos. A avaliação da carga parasitária no fígado, baço e medula óssea foi realizada pela técnica de diluição limitante. Os camundongos BALB/c, machos, infectados por *L.infantum* foram tratados com o TE livre na dose de 12 mg/kg ou com as diferentes formulações lipossomais, com ou sem indução do fenômeno ABC (primeira dose de tratamento com lipossomas peguilados vazios). Os valores de carga parasitária no fígado, baço e medula óssea foram lidos em duplicata, para cada animal de cada um dos 8 grupos.

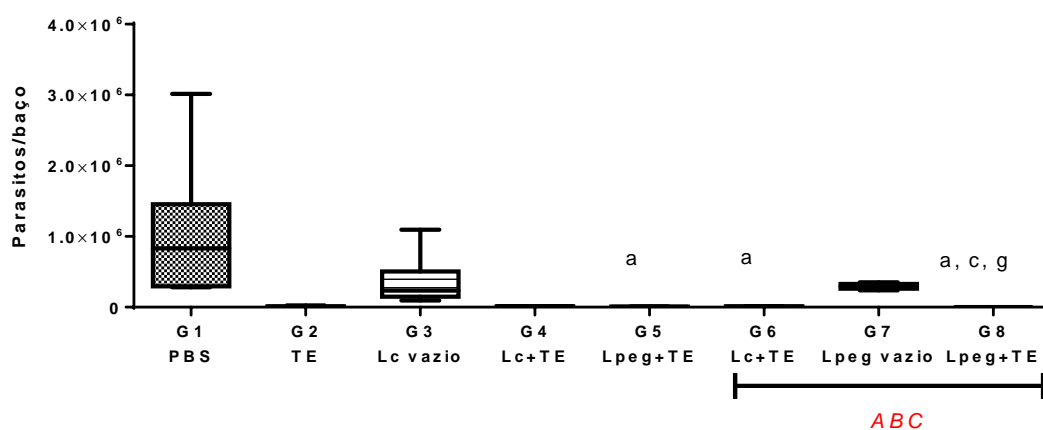
A análise dos dados de fígado dos animais em experimentação demonstrou que os animais dos grupos tratados com o TE livre (G2), lipossoma convencional contendo TE (G4), lipossoma peguilado contendo TE (G5) e lipossoma peguilado contendo TE com indução do fenômeno ABC (G8) apresentaram redução da carga parasitária em relação ao grupo controle (G1). Observou-se que os tratamentos com as formulações vazias (G3 e G7) não mostraram efeito sobre a carga parasitária. Nota-se ainda redução da carga parasitária do grupo tratado com lipossoma peguilado contendo TE com indução do fenômeno (G8) em relação aos grupos tratados com formulações vazias (G3 e G7), porém não teve diferença em relação ao grupo tratado com lipossoma peguilado contendo TE sem indução do fenômeno ABC (G5), o que demonstra que a indução do fenômeno ABC não teve efeito na carga parasitária no fígado dos animais.

Figura 21: Carga parasitária do fígado de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. (PBS) Tampão fosfato. (TE) Tártaro emético. (LC vazio) Lipossoma convencional vazio. (LC + TE) Lipossoma convencional contendo tartárico emético. (LPEG + TE) Lipossoma peguado contendo tartárico emético. (LPEG vazio) Lipossoma peguado vazio. (G1) Primeira e 2ª dose com PBS (controle). (G2) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com tartárico emético livre (12 mg/kg). (G3) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional vazio. (G4) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tartárico emético. (G5) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma peguado contendo tartárico emético. (G6) Primeira dose lipossoma peguado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tartárico emético. (G7) Primeira dose lipossoma peguado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguado vazio. (G8) Primeira dose lipossoma peguado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguado contendo tartárico emético. (ABC) Grupos em que houve indução do fenômeno ABC. Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. Os resultados estão representados como mediana ± valor máximo e valor mínimo. As letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a: (a) G1, (b) G2, (c) G3, (d) G4, (e) G5, (f) G6 e (g) G7.



A análise dos dados de baço dos animais em experimentação demonstrou que os animais dos grupos tratados com lipossoma peguado contendo TE (G5), lipossoma convencional contendo TE (G6) e lipossoma peguado contendo TE com indução do fenômeno ABC (G8) apresentaram redução da carga parasitária em relação ao grupo controle (G1). Nota-se que o tratamento com TE livre (G2) e com as formulações vazias (G3 e G7) não tiveram nenhum efeito sobre a carga parasitária (G3 e G7). Nota-se também, assim como no fígado, redução da carga parasitária do grupo tratado com lipossoma peguado contendo TE com indução do fenômeno (G8) em relação aos grupos tratados com formulações vazias (G3 e G7), porém não houve diferença em relação ao grupo tratado com lipossoma peguado contendo TE sem indução do fenômeno ABC (G5), o que demonstra que a indução do fenômeno ABC não teve efeito na carga parasitária no baço dos animais.

Figura 22: Carga parasitária do baço de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. (PBS) Tampão fosfato. (TE) Tártaro emético. (LC vazio) Lipossoma convencional vazio. (LC + TE) Lipossoma convencional contendo tartarato emético. (LPEG + TE) Lipossoma peguado contendo tartarato emético. (LPEG vazio) Lipossoma peguado vazio. (G1) Primeira e 2ª dose com PBS (controle). (G2) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com tartarato emético livre (12 mg/kg). (G3) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional vazio. (G4) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tartarato emético. (G5) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma peguado contendo tartarato emético. (G6) Primeira dose lipossoma peguado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tartarato emético. (G7) Primeira dose lipossoma peguado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguado vazio. (G8) Primeira dose lipossoma peguado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguado contendo tartarato emético. (ABC) Grupos em que houve indução do fenômeno ABC. Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. Os resultados estão representados como mediana ± valor máximo e valor mínimo. As letras indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação a: (a) G1, (b) G2, (c) G3, (d) G4, (e) G5, (f) G6 e (g) G7.



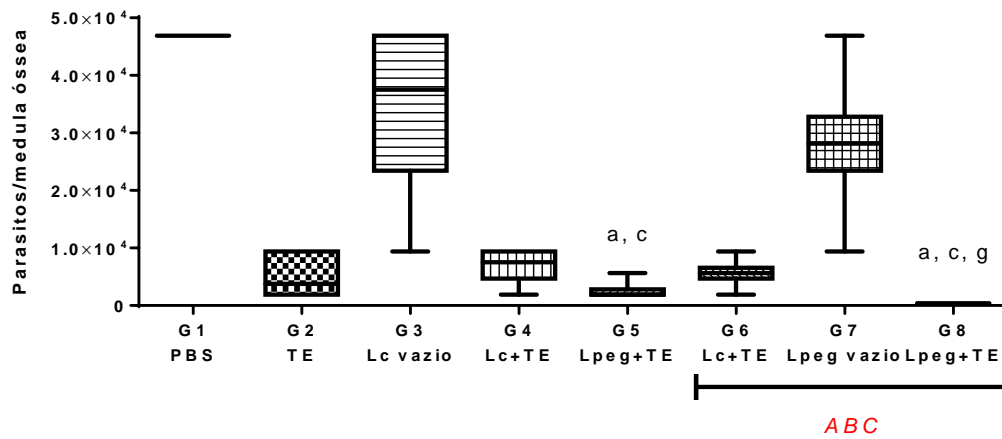
A análise dos dados de medula óssea dos animais em experimentação demonstrou que apenas os grupos tratados com lipossoma peguado contendo TE (G5) e lipossoma peguado contendo TE com indução do fenômeno ABC (G8) apresentaram redução da carga parasitária em relação ao grupo controle (G1). Nota-se que o tratamento com TE livre (G2) e com as formulações vazias (G3 e G7) não tiveram nenhum efeito sobre a carga parasitária (G3 e G7). Nota-se também, assim como observado no fígado e baço, redução da carga parasitária do grupo tratado com lipossoma peguado contendo TE com indução do fenômeno (G8) em relação aos grupos tratados com formulações vazias (G3 e G7), porém não houve diferença em relação ao grupo tratado com lipossoma peguado contendo TE sem indução do fenômeno ABC (G5), o que demonstra que a indução do fenômeno ABC não teve efeito na carga parasitária na medula óssea dos animais.

O fígado é considerado órgão em que o parasito é eliminado, ou seja, em que há resolução da infecção por *Leishmania infantum*, por apresentar inflamação granulomatosa induzida por macrófagos parasitados por amastigotas, o que leva a uma acentuada redução da carga parasitária e resolução da infecção. Já o baço e a medula óssea são considerados sítios de infecção crônica, onde os parasitos permanecem por toda a vida do animal (CARRI et al., 2006).

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

Modelos lipossomais de vetorização de fármacos apresentam bons resultados de acordo com suas características de tamanho e composição que determinam sua distribuição no organismo. Lipossomas pequenos, com diâmetro abaixo de 200 nm, parecem ter acesso facilitado à medula óssea, promovendo a eliminação do parasito albergado nesse tecido (FRÉZARD *et al.*, 2005). Como mostrado, o tamanho dos lipossomas contendo TE, tanto convencional quanto peguilado, foi em torno de 180 nm, o que permitiu sua chegada ao tecido medular.

Figura 23: Carga parasitária da medula óssea de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. (PBS) Tampão fosfato. (TE) Tártaro emético. (LC vazio) Lipossoma convencional vazio. (LC + TE) Lipossoma convencional contendo tartáreo emético. (LPEG + TE) Lipossoma peguilado contendo tartáreo emético. (LPEG vazio) Lipossoma peguilado vazio. (G1) Primeira e 2ª dose com PBS (controle). (G2) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com tartáreo emético livre (12 mg/kg). (G3) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional vazio. (G4) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tartáreo emético. (G5) Primeira dose PBS e 2ª dose tratados com lipossoma peguilado contendo tartáreo emético. (G6) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma convencional contendo tartáreo emético. (G7) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguilado vazio. (G8) Primeira dose lipossoma peguilado vazio e 2ª dose tratados com lipossoma peguilado contendo tartáreo emético. (ABC) Grupos em que houve indução do fenômeno ABC. Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. Os resultados estão representados como mediana ± valor máximo e valor mínimo. As letras indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação a: (a) G1, (b) G2, (c) G3, (d) G4, (e) G5, (f) G6 e (g) G7.



6- RESUMO DE RESULTADOS

O tratamento dos camundongos com formulações convencionais de TE por via endovenosa foi capaz de reduzir a carga parasitária no fígado enquanto as formulações lipossomais de TE foram capazes de reduzir a carga parasitária no fígado, baço e medula óssea dos animais.

Houve redução na produção de IL-10 pelas células do baço dos camundongos tratados com TE livre e com as formulações que continham TE. Não foi observado nenhum efeito na produção de TNF- γ pelas células do baço devido ao tratamento.

O tratamento com TE na forma livre ou na forma lipossomal não causou alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum*.

O TE nem as formulações lipossomais foram capazes de induzir produção de óxido nítrico pelos macrófagos J774-A1.

A indução do fenômeno ABC no tratamento dos camundongos não teve efeito na carga parasitária, na produção de citocinas e nem nos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados.

7- CONCLUSÃO

O tratamento dos camundongos com lipossomas peguilados e convencionais de TE por via endovenosa foi eficaz na redução da carga parasitária nos órgãos avaliados. Ambos os tratamentos induziram uma redução da produção de IL-10 pelas células do baço, não alterando os parâmetros hematológicos e nem a função renal e hepática dos animais. No entanto, o fenômeno ABC não interferiu na carga parasitária, na produção de citocinas e nem nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Apesar do TE provocar redução da produção de IL-10, dados *in vitro* sugerem que o fármaco não interfere na produção de óxido nítrico.

8- REFERÊNCIAS

ALARCÓN-CORREDOR, O., M.; FERNANDÉZ, M., R.; CASTAÑEDA, G., B.; SILVA, T. Alteraciones enzimáticas séricas en ratas tratadas con bisulfito de sodio. **Acta Cient. Venezuel.** 2000.

ALVING, C., R.; STECK, E., A.; CHAPMAN, W., L., JR.; WAITS, V., B.; HENDRICKS, L., D.; SWARTZ, G., M., JR.; HANSON, W., L. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome- encapsulated drugs. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 1978.

ALVING, C., R.; SWARTZ, G., M., JR.; HENDRICKS, L., D.; CHAPMAN, W., L., JR.; WAITS, V., B.; HANSON, W., L. Liposomes in leishmaniasis: effects of parasite virulence on treatment of experimental leishmaniasis in hamsters. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 1984.

ATSDR – Agency for toxic substances and disease registry. Antimony. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts23.pdf>. Acesso em: fev/ 2016.

AVGOUSTAKIS, K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. **Curr. Drug Deliv.** 2004.

AWASTHI, A.; MATHUR, R., K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.** 2004.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E., M. Immunopathogenesis of visceral leishmaniasis. **Gaz. Méd. Bahia.** 2005.

BANERJEE, A.; DE, M.; ALI, N. Combination therapy with paromomycin associated stearylamine-bearing liposomes cures experimental visceral leishmaniasis through Th1-biased immunomodulation. **Antimicrob. Ag. Chemother.** 2011.

BANGS, J., D.; RANSOM, D., A.; NIMICK, M.; CHRISTIE, G., H.; Mol. In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. **Biochem. Parasitol.** 2001.

BASU, R.; BHAUMIK, S.; BASU, J. M.; NASKAR, K.; DE, T.; ROY, S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.** 2005.

BATISTA, C., M.; CARVALHO, C., M., B.; MAGALHÃES, N., S., S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Braz. Jour. of Pharm. Sci.** 2007.

BERMAN, J., D. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Curr. Opin. in Infect. Dis.** 2003.

BOGDAN, C. The function of nitric oxide in the immune system. **Handb. of Experim. Pharmacol.** 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2ª ed. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral – descrição da doença. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11330-descricao-da-doenca>. 2014.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Grave - Normas e Condutas. Brasília – DF, 2006.

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

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

CASTRO, R., A., O. Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico, em camundongos balb/c infectados com *Leishmania infantum*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, 2012.

CASTRO, R., A., O.; SILVA-BARCELLOS, N., M.; LICIO, C., S., A.; SOUZA, J., B.; SOUZA-TESTASICCA, M., C.; FERREIRA, F., M.; BATISTA, M., A.; SILVEIRA-LEMONS, D.; MOURA, S., L.; FRÉZARD, F.; REZENDE, S., A. Association of liposome-encapsulated trivalent antimonial with ascorbic acid: an Effective and Safe Strategy in the Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. **Plos One**. 2014.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R., W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Ver. Microbiol**. 2007.

COSTA, W., C. Hemocompatibilidade e efeito sobre o sistema imune de lipossomas vazios compostos de dicetilfofato ou dipalmitoilfosfatidilglicerol. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, 2015.

CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health**. 2001.

CRUZ, A.; RAINEY, P., M.; HERWALDT, B., L.; STAGNI, G.; PALACIOS, R.; TRUJILLO, R.; SARAIVIA, N., G. Pharmacokinetics of antimony in children treated for leishmaniasis with meglumine antimoniate. **J. Infect Dis**. 2007.

CUNHA, A., M; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*, **Nota prévia Hosp**. 1937.

CUNNINGHAM, M., L.; FAIRLAMB, A., H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterization and inhibition by trivalent antimonials. **Eur. J. Biochem.** 1995.

DALTON, R., N. Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade. **Bras. Patol. Med. Lab.** 2011.

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

DE WOLF, F., A. Antimony and health. **Brit. Med. J.**, London. 1995.

DEANE, L., M. Leishmaniose visceral no Brasil – estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. **Rio de Janeiro: Serviço nacional de educação sanitaria.** 1955.

DELGADO, J.; MACÍAS, J.; PINEDA, J.; CORZO, J., E.; GONZÁLEZ-MORENO, M., P.; DE LA ROSA, R. High frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 infected patients. **The Am. J. Trop. Hyg.** 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 2004.

DIAS, F., O., P.; LOROSA, E., S.; RABELO, J., M., M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (*Pschycodidae*, *Phlebotominae*). **Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro.** 2003.

DIETZE, R. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, S; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical.** 2003.

FALEIRO, R., J.; KUMAR, R.; HAFNER, L., M.; ENGWERDA, C., R. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **Plos Negl. Trop. Dis.** 2014.

FALQUETO, A.; SESSA, P., A. Leishmaniose tegumentar americana. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia.** 2005.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 2000.

FREITAS, J., C., C.; NETO, D., C., S., L.; SANTOS, B., E.; ABREU, G., J., L.; BRAGA, C., R., A.; CAMPOS, R., R.; MORAIS, R.; FERNANDES, L. O Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.** 2012.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; FERREIRA, C., S.; COSTA, M., A. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2001a.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D., A.; ROCHA, O., G., F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova.** 2005b.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R., R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules.** 2009c.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.** 2006.

GHALIB, H., W.; PIUVEZAM, M., R.; SKEIKY, Y., A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F., A.; EL-HASSAN, A., M.; RUSSO, D., M.; REED, S., G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.** 1993.

GIUNCHETTI, R., C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C., M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O., A.; MARQUES, M., J.; TAFURI, W., L.; REIS, A., B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.** 2007.

GONTIJO, C., M., F.; MELO, M., N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. de Epid.** 2004.

GOODWIN, L., G.; PAGE, J., E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem. J.** 1943.

HENDRICKX, S.; MONDELAERS, A.; EBERHARDT, E.; DELPUTTE, P.; COS, P.; MAES, L. In Vivo Selection of Paromomycin and Miltefosine Resistance in *Leishmania donovani* and *L.infantum* in a Syrian Hamster Model. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2015.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet.** 1999.

HOPE, M., J.; BALLY, M., B. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chem Phys Lipids*, v. 40, p. 89-95, 1986. HUNTER, D. G., FRISKEN, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. **Biophys. J.** 1998.

ISHIDA, T.; KIWADA, H. Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. **Int. J. Pharm.** 2008.

ISHIDA, T.; MAEDA, R.; ICHIHARA, M.; MUKAI, Y.; MOTOKI, Y.; MANABE E.; IRIMURA, K.; KIWADA, H. The accelerated clearance on repeated injection of PEGylated liposomes in rats: laboratory and histopathological study. **Cell Mol. Biol. Lett.** 2002.

ISHIDA, T.; ICHICHA, M.; WANG, X.; KIWADA, H. Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of pegylated liposomes. **J. of Control. Rel.** 2006.

ISHIDA, T.; WANG, X.; SHIMIZU, T.; NAWATA, K.; KIWADA, H. Pegylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. **J. of Control. Rel.** 2007.

KILICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D., H.; RIOUX, J., A.; LANOTTE, G.; LEANEY, A., J. Possible origins of *Leishmania chagasi*. Amer. **J. of Trop. Med. and Hyg.** 1980.

LAINSON, R.; SHAW, J., J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, KillickKendrick R. **The Leishm. in Biol. and Med.** 1987.

LAINSON, R; SHAW, J., J. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie S.H., Despommier D.D., editors. Topley & Wilson's. **Microb. and Microb. Infec.: parasitol.** 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J., J.; READY, P., D.; MILES, M., A.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Trans Royal Soc. of Trop. Med. Hyg.** 1981.

LAINSON, L.; SHAW, J., J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In *Biology of the Kinetoplastida*. **London and New York: Academic Press.** 1979.

LANOTTE, G.; RIOUX, J., A.; MAAZOUN, R.; PASTEUR, N.; PRATLONG, F.; LEPART, J. The application of a numerical method to the taxonomy of the genus *Leishmania* Ross, 1903,--The recognition of 146 original lines in the Old World. Use of allozymic 71 characters. Epidemiological and phyletic significance. **Ann Parasitol. Human.** 1981.

LAPCHIK, V., B., V.; MATTARAIA, V., G., M.; KO, G., M. (Orgs). **Cuidados e Manejo de Animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. 730p

LASIC, D., D. Novel applications of liposomes. **Trends In Biotech.** 1998.

LAVERMAN, P.; CARSTENS, M., G.; BOERMAN, O., C.; DAMS, E., T.; OYEN, W., J.; VAN ROOIJEN, N.; CORSTENS, F., H.; STORM, G. Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 2001.

LEAL, G., G., A.; ROATT, B., M.; AGUIAR-SOARES, R., D., O.; CARNEIRO, C., M.; GIUNCHETTI, R., C.; CARVALHO, A., T.; MARTINS-FILHO, O., A.; FRANCISCO, A., F.; CARDOSO, J., M.; MATHIAS, F., A., S.; CORREA-OLIVEIRA, F.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W.; REIS, A., B. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veter. Parasitol.** 2014.

LÉGARÉ, D.; RICHARD, D.; MUKHOPADHYAY, R.; STIERHOF, Y. D.; ROSEN, B. P.; HAIMEUR, A.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. **J. Biol. Chem.** 2001.

LI, Y.; SUN, X.; WANG, L.; ZHOU, Z.; KANG, Y., J. Myocardial toxicity of arsenic trioxide in a mouse model. **Cardiov. Toxicol.** 2002.

LICIO, C., S., A. Avaliação da toxicidade aguda do antimônio trivalente encapsulado em lipossomas – convencional ou peguilado – associados ou não à administração de ácido ascórbico. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

LIEW, F., Y. Cytokines and nitric oxide as ejector molecules against parasitic infections. **Phil. Transac. of the Roy. Soc.** 1997.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunob.** 2008.

LII, C., K.; CHEN, H., W.; YUN., T.; LIU, K., L. Supressive effects of wild bitter gourd (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responsy in RAW 264.7 macrophages. **J. Ethnopharm.** 2009.

LILA, A., A.; KIWADA, H.; ISHIDA, T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. **J. of Control. Release.** 2013.

LIU J.; CHEN, H.; MILLER, D., S.; SAAVEDRA, J., E.; KEEFER, L., K.; JOHNSON, D., R.; KLAASSEN, C., D.; WAALKES, M., P. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. **Mol. Pharmacol.** 2001.

LUKES, J.; MAURICIO, I., L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J., C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J., P.; KUHL, K.; TINTAYA, K., W.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F., J.; MILES, M., A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy, **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2007.

MAAZOUN, R., G.; LANOTTE, N.; PASTEUR, J., A.; RIOUX, M., F.; KENNOU, F., PRATLONG. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 16. Contribution à l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. A propos de 55 souches isolées en Cévenne, Côte-d'Azur, Corse et Tunisie. **Annal. de Parasitol. Hum. et Comp.** 1981.

McCONVILLE, M., J.; TURCO, S., J.; FERGUSON, M., A.; SACKS, D., L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO J.** 1992.

McDOWELL, M., A.; SACKS, D., L. Inhibition of host cell signal transduction by Leishmania: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. **Curr. Opin. in Microb.** 1999.

MACHADO, L., C.; GNOATTO, S., A.; KLÜPPEL, M., L., W. Liposomes applied in pharmacology: a review. **Estud. Biol.** 2007.

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

MAURICIO, I., L.; STOTHARD, J., R.; MILES, M., A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today.** 2000.

MEDEIROS, C., M., O.; MELO, A., G., C.; LIMA, A., K., F.; SILVA, I., N., G.; OLIVEIRA, L., C.; SILVA, M., C. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Cien. Anim.** 2008.

MELO, F., A.; MOURA, E., P.; RIBEIRO, R., R.; ALVES, C., F.; CALIARI, M., V.; TAFURI, W., L.; CALABRESE, K., S.; TAFURI, W., L. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Int. J. Exp. Pathol.** 2009.

MIEKELEY, N.; MORTARI, S., R.; SCHUBACH, A., O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Anal. Bioanal. Chem.** 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/7700-svs-divulga-novo-protocolo-de-tratamento-para-a-leishmaniose-visceral>. Acesso em jan/ 2016.

MONNARD, P., A.; OBERHOLZER, T., LUISI, P., L. Entrapment of nucleic acids in liposomes. **Biochim. Biophys. Acta.** 1997.

MOREIRA, N., D.; SOUZA, J., D.; ROATT, B., M.; VIEIRA, P., M., A.; KER, H., G.; CARDOSO, J., M., O.; GIUNCHETTI, R., C.; CARNEIRO, C., M.; LANA, M.; REIS, A., B. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. **Plos One**. 2012.

MORENO, G.; RIOUX, J., A.; LANOTTE PRATLONG F.; SERRES, E. Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numerique. Individualization du Complex L. infantum. A propos de 146 souches originaires de l Ancien et Nouveau Monde. In **J. A. Rioux (ed.), *Leishmania***. Taxonomie et phylogenèse. Applications éco-épidémiologiques. 1986.

MOSQUEIRA, V., C., F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **J. Pharm. Sci.** 2000.

MOTTA, V., T. Bioquímica Clínica Para o Laboratório Princípios e Interpretações, 4 Edição. Porto Alegre. Editora Médica Missau. 2003.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol. Rev.** 2011.

MUKHOPADHYAY, R.; DEY, S.; XU, N.; GAGE, D.; LIGHTBODY, J.; OUELLETTE, M.; ROSEN, B., P. Trypanothione over production and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 1996.

NEEDHAM, D.; McINTOSH, T., J.; LASIC, D., D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta.** 1992.

NEW, R., R.; CHANCE, M., L.; THOMAS, S., C.; PETERS, W. Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. **Nature**, v. 272 (5648), p. 55-6, 1978.

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

PEREIRA, C. C.; MOREIRA, M. L.; SOARES, R. P.; MARTELETO, B. H.; RIBEIRO, V. M.; FRANCA-DIAS, M. H.; CARDOSO, L. M.; VIANA, K.F.; GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; ARAUJO, M. S. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. **BMC Veter. Res.** 2015.

PERASOLI, F., B. Micelas de poloxamer 407 contendo anfotericina B para o tratamento da leishmaniose visceral. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Ouro Preto, Minas Gerais. Universidade Federal de Ouro Preto. 2016.

PINHEIRO, J., R., N., F.; HERMIDA, M., D., R.; MACEDO, M., P.; MENGEL, J.; BAFICA, A.; DOS-SANTOS, W., L., C. *Leishmania* infection impairs beta 1-Integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.** 2006.

PRAKASH, D.; FESEL, C.; JAIN, R.; CAZENAVE, P., A.; MISHRA, G., C.; PIED, S. Clusters of cytokines determine malaria severity in plasmodium falciparum–infected 107 patients from endemic Areas of Central India. **J. Infect. Dis.** 2006.

PUENTES, S., M.; DA SILVA, R., P.; SACKS, D., L.; HAMMER, C., H.; JOINER, K., A. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **The J. of Immunol.** 1990

RATH, S. TRIVELIN, L., A.; IMBRUNITO, T., R.; TOMAZELA, D., M.; JESÚS, M., N.; MARZAL, P., C.; ANDRADE, J., H., F.; TEMPONE, A., G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quím. Nova.** 2003.

RIBEIRO, A., L., P. Electrocardiographic Changes During Low-Dose, Short-Term Therapy of Cutaneous Leishmaniasis with the pentavalent antimonial Meglumina. **Brazilian J. of Med. and Biolog. Res.** 1999.

RIBEIRO, R., R.; MOURA, E., P.; PIMENTEL, V., M.; SAMPAIO, W., M.; SILVA, S., M.; SCHETTINI, D., A.; ALVES, C., F.; MELO, F., A.; TAFURI, W., L.; DEMICHELI, C.; MELO, M., N.; FRÉZARD, F.; MICHALICK, M., S. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob. Ag. and Chemother.** 2008.

ROBERTS, W., L.; HERMAN, J., D.; RAINEY, P., M. In Vitro Anti-Leishmanial Properties of Tri- and pentavalent Antimonial preparations. **Antimicrob. Ag. and Chemother.** 1995.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. **Brit. Med. J.** 1903.

SACKS, D., L.; LAL, S., L.; SHRIVASTAVA, S., N.; BLACKWELL, J.; NEVA, F., A. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. **J. Immunol.** 1987.

SAGRISTÁ, M., L.; MORA, M.; MADARIAGA, M., A. Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 2000.

SCHETTINI, D., A.; COSTA VAL, A., P.; SOUZA, L., F.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O., G.; MELO, M., N.; MICHALICK, M., S., FRÉZARD, F. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 2003.

SCHETTINI, D., A.; RIBEIRO, R., R.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O., G.; MELO, M., N.; MICHALICK, M., S.; FRÉZARD, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **Int. J. Pharm.** 2006.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I.; CUNY, G.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J., L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob. Ag. and Chemother.** 2001.

SHAKED-MISHAN, P.; ULRICH, N.; EPHROS, M.; ZILBERSTEIN, D. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.** 2001.

SILVEIRA, F., T.; LAINSON, R.; CORBETT, C., E., P. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2005.

SNYDER, S., H.; BREDT, D., S. Biological role of nitric oxide. **Science Am** 1992.

SOARES, R., D., O., A.; ROATT, B., M.; KER, H., G.; MOREIRA, N., D.; MATHIAS, F., A., S.; DE OLIVEIRA CARDOSO, J., M.; GONTIJO, N., F.; BRUNAROMERO, O.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O., A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A.B. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4+ and CD8+) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. **Parasit. & Vect.** 2014.

SZEBENI, J; BARENHOLZ, Y. Adverse Immune Effects of Liposomes: Complement Activation, Immunogenicity and Immune Suppression. *Harnessing biomaterials for Nanomedicine: Preparation, toxicity and applications.* 2009.

TAVARES, W.; MARINHO, L., A., C. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 2005.

TONELLI, E.; FREIRE, L., M., S. Doenças infecciosas na infância e na adolescência. 2 ed. Belo Horizonte: **Medsa**, 2000.

TORCHILIN, V., P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Rev. Drug Disc.** 2005.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.** 2007.

TRIPATHI, P. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol. and Med. Microb.** 2007.

WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; DONHAUSER, N.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C.; KÖRNER, H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. **J. Immunol.** 2001.

WHO - World Health Organization. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em 21 jun. 2015.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em:http://http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf

ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
OURO PRETO



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito do fenômeno ABC na atividade leishmanicida de formulações lipossomais peguiladas contendo o antimônio trivalente em camundongos BALB/c infectados com Leishmania infantum chagasi

Pesquisador: Simone Aparecida Rezende

Versão: 1

CAAE: 49435615.6.0000.5150

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ouro Preto

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 095970/2015

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Ouro Preto

ANEXO II



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2013/39 relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "O fenômeno ABC favorece a resposta contra a *Leishmania infantum*?", que tem como responsável a Profa. Dra. Simone Aparecida Resende, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em 31/07/2016.

Ouro Preto, 24 de julho de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA-UFOP