REGINA MAIA DE SOUZA

**Utilização da nanoemulsão lipídica no tratamento
experimental da leishmaniose cutânea**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Valdir Sabbaga Amato

(Versão Corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**SÃO PAULO
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Regina Maia de
Utilização da nanoemulsão lipídica no tratamento
experimental da leishmaniose cutânea / Regina Maia
de Souza. -- São Paulo, 2019.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Valdir Sabbaga Amato.

Descritores: 1. Leishmaniose cutânea
2. Anfotericina B 3. Nanoemulsão lipídica
4. Quilomicrons 5. Reação em cadeia da polimerase em
tempo real

USP/FM/DBD-094/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços”

Albert Einstein

Dedico este trabalho:

Aos meus pais João (*in memoriam*) e Wanda (*in memoriam*).

Ao meu esposo Carlos Roberto às minhas filhas Marcella e Renata.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Valdir Sabbaga Amato, pela confiança no meu trabalho, pela minha inclusão no seu grupo de pesquisa, pelos valiosos ensinamentos, por todas oportunidades que culminaram no meu crescimento profissional e pela amizade ao longo desses anos.

Ao Professor Dr. Vicente Amato Neto (*in memoriam*), pelo incentivo, ensinamentos, por sempre acreditar no meu potencial e pela amizade.

Ao Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Ao Professor Dr. Raul Cavalcante Maranhão, do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração, pela relevante colaboração no desenvolvimento da nanopartícula para a concretização desse projeto.

À Professora Dra. Ester Cerdeira Sabino, pelo incentivo e apoio para a execução desse trabalho.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica, em especial à Professora Dra. Maria Irma Seixas Duarte, pela paciência, colaboração e expertise nas análises histopatológicas.

Ao Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração, em especial à Dra. Elaine Rufo Tavares, pela dedicação, ensinamentos e sugestões.

Ao Professor Ronaldo Cesar Borges Gryscek, pelas sugestões e ensinamentos.

Ao Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr. e ao Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto, pelos ensinamentos e sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz, pelo treinamento em leishmanioses.

Ao Prof. Dr. Rui Imamura, pelos ensinamentos e sugestões.

Às biologistas Marcia Hage e Natália Souza de Godoy, pelo apoio, colaboração e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia LIM 46, Erika Regina Manuli, Léa Campos Oliveira e aos alunos Lucas Franco, Flávia Sales, Camila Cruz, Roberta Cristina Ruedas, Cássia Gomes, Ingra Morales, Geovana Pereira e Regina Garrini.

A todos colegas do Laboratório de Soroepidemiologia, Imunobiologia Celular e Molecular do Instituto de Medicina Tropical.

Aos Professores Dr. Paulo Cesar Cotrim, Dra. Thelma Suely Okay, que sempre me acolheram em seus laboratórios para o desenvolvimento das atividades.

À mestra Edite Kanashiro, pela paciência, ensinamentos, sugestões, apoio e amizade.

À Dra. Vera Lúcia Freitas, pelas sugestões.

À Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro, do Laboratório de Micologia, pelo fornecimento do DNA de fungos para o teste de especificidade do *primer*.

À Cleusa Takura, pela captura das imagens da microscopia eletrônica e fotodocumentação das análises histopatológicas.

À bióloga Mussya Cisotto Rocha e à mestranda Mariane Pereira Brito, pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Ao Rogério Ruscitto do Prado, pelo apoio estatístico.

À Roseli Antonia Santo e à Luiza Maria Assis Vieira, pelo apoio administrativo.

Aos colegas do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por todo apoio no fornecimento e manutenção dos animais.

Ao Laboratório de Análises Especiais (LAE-LIM 03) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo empenho e realização dos testes laboratoriais.

A todos os colegas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste projeto.

Aos meus pais João e Wanda (*in memoriam*), pelo amor, dedicação e ensinamentos durante os anos de convívio.

Ao meu esposo Carlos Roberto e às minhas filhas Marcella e Renata, pelo incentivo, compreensão, amor e carinho e à minha irmã Denise e família.

A todos parentes e amigos.

A Deus, pela minha existência e por iluminar o meu caminho.

Agradecimentos Especiais

Ao CNPQ pelo financiamento desse trabalho (processo nº 479291/2012-8).

À FAPESP pelo financiamento desse trabalho (processo 2015/10038-0).

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Leishmanioses: Aspectos Gerais.....	2
1.2	Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar.....	5
1.3	Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	6
1.3.1	Leishmaniose cutânea localizada.....	6
1.3.2	Leishmaniose mucocutânea.....	6
1.3.3	Leishmaniose difusa.....	7
1.3.4	Leishmaniose disseminada.....	8
1.4	Diagnóstico Laboratorial.....	8
1.5	Diagnóstico Diferencial.....	10
1.6	Tratamento.....	10
1.6.1	Monitoramento do tratamento.....	15
1.7	Nanopartículas.....	16
1.7.1	Emulsões Lipídicas.....	17
1.7.1.1	Quilomícrons.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo Geral.....	24
2.2	Objetivos Específicos.....	24
3	MÉTODOS.....	26
3.1	Aspectos Éticos.....	27
3.2	Modelo Experimental.....	27
3.3	Amostras.....	28
3.4	Parasitos.....	28
3.4.1	Purificação das formas amastigotas <i>L. amazonensis</i>	29
3.4.2	Cultivo das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	29
3.5	Cultivo de Macrófagos Murinos Linhagem J774.....	30
3.6	Formulações.....	31
3.6.1	Anfotericina B desoxicolato.....	31
3.6.2	Anfotericina B desoxicolato associada ao quilomícron artificial (QMA).....	31
3.7	Ensaio <i>In Vitro</i>	32
3.7.1	Determinação da concentração inibitória IC ₅₀ das formulações QMA, AB e QMA-AB em formas promastigotas pelo método colorimétrico MTT.....	33

3.7.2	Alterações estruturais das formas promastigotas (microscopia eletrônica de transmissão [MET]).....	33
3.7.3	Determinação da concentração citotóxica CC ₅₀ das formulações QMA, AB e QMA-AB em macrófagos murinos linhagem J774 pelo método colorimétrico MTT.....	34
3.7.4	Determinação da taxa de infecção dos macrófagos murinos linhagem J774 tratados com QMA, AB e QMA-AB.....	35
3.8	Estudo <i>In Vivo</i>	36
3.8.1	Testes de toxicidade em camundongos BALB/c sadios	36
3.8.2	Análise histopatológica dos rins e fígados dos camundongos BALB/c sadios	37
3.8.3	Infecção dos camundongos BALB/c	37
3.8.4	Delineamento do tratamento	37
3.8.5	Aferição do diâmetro das patas e peso dos camundongos BALB/c	38
3.8.6	Pós-tratamento: eutanásia e coleta das amostras biológicas dos camundongos BALB/c para as análises bioquímicas, hematológicas e histopatológicas.....	38
3.9	Testes Moleculares.....	39
3.9.1	Extração do DNA.....	39
3.9.2	Quantificação e qualidade dos DNAs	40
3.9.3	Sensibilidade analítica e eficiência da qPCR <i>Real Time Sybr Green</i> [®]	40
3.9.4	Especificidade do primer	41
3.9.5	Quantificação absoluta qPCR <i>Real-Time Sybr Green</i> [®] das amostras de tecido dos camundongos infectados e tratados com QMA, AB e QMA-AB	42
3.10	Análise Estatística.....	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	Estudo <i>In Vitro</i>	44
4.1.2	Determinação da concentração inibitória IC ₅₀ das formulações QMA, AB, e QMA-AB em formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> pelo método colorimétrico MTT	45
4.1.3	Alterações estruturais das formas promastigotas observadas por MET	46
4.1.4	Determinação da concentração citotóxica CC ₅₀ das formulações QMA-AB, AB e QMA em macrófagos murinos linhagem J774 pelo método colorimétrico MTT.....	47
4.1.5	Determinação da taxa de infecção dos macrófagos J774 tratados com QMA, AB e QMA-AB.....	48
4.2	Estudo <i>In Vivo</i>	51
4.2.1	Testes de toxicidade em camundongos BALB/C sadios (análises histopatológicas)	51
4.2.2	Tratamento	55
4.2.2.1	Aferição do peso dos camundongos BALB/c infectados tratados	55
4.2.2.2	Aferição do diâmetro das patas dos camundongos BALB/c infectados tratados.....	56
4.2.2.3	Exames bioquímicos	60

4.2.2.4	Hemograma dos camundongos BALB/c infectados tratados com as formulações	60
4.2.2.5	Exames histopatológicos dos rins e fígados dos camundongos BALB/c infectados e tratados com QMA, AB e QMA-AB.....	61
4.2.2.6	Sensibilidade analítica e linearidade da reação de qPCR <i>Real Time Sybr Green</i> [®]	62
4.2.2.7	Especificidade do primer	66
4.2.2.8	Quantificação absoluta das amostras de tecido dos camundongos tratados qPCR <i>Real Time</i>	66
5	DISCUSSÃO.....	69
6	CONCLUSÕES	81
7	ANEXO	84
8	REFERÊNCIAS	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	- Anfotericina B desoxicolato
BOD	- Demanda biológica de oxigênio
CAPPESeq	- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CC ₅₀	- Concentração citotóxica 50%
CO ₂	- Dióxido de carbono
Ct	- <i>Cycle threshold</i>
D.O.	- Densidades óticas
DMPC	- diesteroilfosfatidilcolina
DMPG	- Diesteroilfosfatidilglicerol
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-cético
EV	- Endovenosa
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
H&E	- Hematoxilina e eosina
IC ₅₀	- Concentração inibitória 50%
IDRM	- Intradermorreação de Montenegro
IFI	- Imunofluorescência indireta
IFN-γ	- Interferon-gama
IL	- Interleucina
IM	- Intramuscular
IS	- Índice de seletividade
IUPAC	- <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kDNA	- DNA de cinetoplasto
LC	- Leishmaniose cutânea localizada
LCD	- Leishmaniose cutânea difusa
LCL	- Leishmaniose cutânea localizada
LD	- Leishmaniose disseminada
LM	- Leishmaniose mucosa
LMC	- Leishmaniose mucocutânea
LPG	- Lipofosfoglicano

LT	- Leishmaniose tegumentar
LV	- Leishmaniose visceral
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide
NNN	- Novy-Nicolle- McNeal (meio de cultura)
NPs	- Nanopartículas
NQ	- Quitosana
NQC	- Sulfato de condroitina
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PBS	- Tampão fosfato salino
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	- Potencial hidrogeniônico
PMN	- Polimorfonucleares
QMA	- Nanopartícula lipídica artificial semelhante ao quilomícron
qPCR <i>Real Time</i>	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RPMI 1640	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
SBF	- Soro fetal bovino
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
TE	- Tris-etilenodiamina tetra-acético
Th	- Linfócito T helper
TNF α	- Fator de necrose tumoral alfa
USP	- Universidade de São Paulo
VP	- Vacúolo parasitóforo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico.....	4
Figura 2 -	Situação da endemicidade da leishmaniose cutânea, 2013.....	5
Figura 3 -	Estrutura química da anfotericina B	13
Figura 4 -	Produção de quilomícrons por uma célula intestinal	20
Figura 5 -	Classificação das lipoproteínas plasmáticas	21
Figura 6 -	Visualização microscópica do teste MTT: (1) macrófagos J774 não tratados, (2) macrófagos J774 viáveis após tratamento com formação dos cristais de formazan e (3) macrófagos J774 não viáveis após tratamento sem formação de cristais de formazan	32
Figura 7 -	Alterações estruturais por MET-Microscopia eletrônica de transmissão das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> incubadas por 24 horas após tratamento com as concentrações das formulações que inibiram o crescimento de 50% das leishmanias (IC ₅₀): (A) promastigota controle não apresenta alterações estruturais (BF) bolsa flagelar, (N) Núcleo, (F) flagelo e (K) cinetoplasto; (B) promastigotas tratadas com QMA, há espessamento mitocondrial (K) e o núcleo (N) apresenta-se eletrodenso, (C) promastigotas tratadas com AB, há alteração na forma com presença de pequenas vesículas na membrana (seta preta) e no conteúdo citoplasmático; (D) promastigotas tratadas com QMA-AB, há alteração regressiva das formas, estrutura nuclear e degeneração citoplasmática, mas não há alteração do cinetoplasto (K)	46
Figura 8 -	Microscopia óptica da atividade leishmanicida contra <i>Leishmania amazonensis</i> : (A) macrófagos J774 sem infecção (controle negativo), (B) macrófagos J774 infectados sem tratamento, (C) (D) e (E) macrófagos J774 infectados tratados com concentração de 1,56 µg/mL das formulações QMA, AB e QMA-AB (as setas indicam as formas amastigotas intracelulares e a barra 5 µm, 100x)	50

- Figura 9 - Fotomicrografia dos exames histopatológicos dos rins e fígados dos camundongos saudáveis corados com hematoxilina e eosina. (A) fígado com esteatose microgoticular QMA-AB 16 mg/kg/dia (400X); (B) fígado com esteatose severa difusa, QMA-AB 20 mg/kg/dia (400 X); (C) fígado com nódulo inflamatório, AB 2,5 mg/kg/dia (400x), (D) fígado com esteatose hepática moderada difusa, AB 5,0 mg/kg/dia (400x); (E) rim mostrando congestão intensa dos vasos, AB 5,0 e 10 mg/kg/dia (400x), (F), rim com esteatose nos túbulos proximais e distais QMA-AB 30 e 35 mg/kg/dia (400X), (G) rim normal e (H) fígado normal..... 54
- Figura 10 - As imagens 1A, 2A e 3A representam os grupos QMA-AB, AB e QMA antes do tratamento, respectivamente. As imagens 1B, 2B e 3B representam os mesmos grupos depois do tratamento. N e P representam os controles, negativo e positivo 59
- Figura 11 - (A) Gráfico da curva padrão amplificada da qPCR utilizando o *primer* kDNA1 *L. amazonensis* a partir do DNA extraído da amostra de 25mg de tecido de camundongo saudável batizado com 10^7 formas promastigotas de cultura e eluído em 100 μ l de tampão de eluição e submetido à diluição seriada (sete pontos- 10^5 - 10^{-1}) (B) Curva de *melting* 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Descrição das densidades óticas do teste MTT com formas promastigotas e macrófagos J774 segundo os grupos	44
Tabela 2 -	Valores do CC ₅₀ para macrófagos J774 e IC ₅₀ para formas promastigotas de <i>leishmania amazonensis</i> e seus respectivos índices de seletividade	51
Tabela 3 -	Testes de Toxicidade em camundongos BALB/c sadios.....	53
Tabela 4 -	Resultado das comparações dos pesos dos animais entre grupos e momentos de avaliação	56
Tabela 5 -	Resultado das comparações dos diâmetros das patas dos animais entre os grupos em cada momento de avaliação	58
Tabela 6 -	Resultado das dosagens de ureia e creatinina sérica dos camundongos BALB/c segundo os grupos	60
Tabela 7 -	Resultados do eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas expressos como média ± desvio padrão.....	60
Tabela 8 -	Resultados das análises histopatológicas dos rins e fígados dos animais infectados tratados com QMA, AB e QMA-AB	61
Tabela 9 -	Valores dos <i>Cts</i> (<i>cycle threshold</i>) intra e interensaios e suas respectivas médias, desvios padrão e coeficientes de variação	63
Tabela 10 -	Resultado da quantificação dos parasitos nas amostras de tecido dos camundongos tratados segundo os grupos	67
Tabela 11 -	Resultado das comparações das médias dos parasitos nas amostras de tecidos dos camundongos tratados segundo os grupos.....	68

Gráfico 1 -	Teste colorimétrico MTT para avaliação da viabilidade celular das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com as formulações AB, QMA e QMA-AB. QMA-AB e AB* <i>vs</i> QMA ($p<0,001$), QMA-AB ^{&} <i>vs</i> QMA ($p<0,01$) AB [#] <i>vs</i> QMA ($p<0,05$) e QMA-AB ^{\$} <i>vs</i> AB ($p<0,05$). A figura mostra a média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A linha vermelha representa 50% de viabilidade celular	45
Gráfico 2 -	Teste colorimétrico com MTT para avaliação da viabilidade dos macrófagos J774 tratados com as formulações AB, QMA e QMA-AB. QMA-AB e AB* <i>vs</i> QMA ($p<0,001$), QMA-AB ^{\$} <i>vs</i> QMA ($p<0,05$) QMA-AB [#] <i>vs</i> QMA ($p<0,05$). A figura mostra a média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A linha vermelha representa 50% de viabilidade celular	47
Gráfico 3 -	Atividade leishmanicida das formulações QMA, AB e QMA-AB em macrófagos J774 infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> com 3 concentrações: 1,56, 3,125 e 6,25 μ g/mL. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP (n = 3) QMA-AB* <i>vs</i> QMA $p<0,01$; QMA-AB [#] <i>vs</i> AB $p<0,01$ QMA-AB ^{\$} <i>vs</i> QMA $p<0,05$	48
Gráfico 4 -	Número de formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> por macrófago (J774) tratados com 3 concentrações: 1,56; 3,125 e 6,25 μ g/mL. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP (n=3). QMA-AB* <i>vs</i> QMA $p<0,05$; QMA-AB [#] <i>vs</i> QMA $p<0,01$, AB ^{\$} <i>vs</i> QMA $p<0,05$	49
Gráfico 5 -	Evolução temporal dos perfis médios dos pesos dos animais e respectivos erros padrões segundo grupos	55
Gráfico 6 -	Evolução temporal dos perfis médios dos diâmetros das patas dos animais e respectivos erros padrões segundo os grupos	57
Gráfico 7 -	Quantificação absoluta de parasitos por miligrama de tecido da pata dos camundongos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com QMA, AB e QMA-AB por qPCR- <i>Real Time</i>	66

RESUMO

Souza RM. *Utilização da nanoemulsão lipídica no tratamento experimental da leishmaniose cutânea* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: A leishmaniose tegumentar americana (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, de transmissão vetorial com ciclo heteroxênico causada por parasitos do gênero *Leishmania*. É considerada uma enfermidade polimórfica que acomete pele e mucosas. Os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da doença são insatisfatórios devido à sua eficácia limitada e seus efeitos colaterais, além do alto custo e a resistência que os protozoários acumulam contra essas drogas. O aumento da tolerabilidade é fundamental para o êxito global do tratamento. As formulações lipídicas comerciais da anfotericina B (AB), Ambisome[®], Abelcet[®] e Amphocil[®], apresentaram-se como um avanço no tratamento da (LT). Sistemas de nanoemulsões lipídicas reduzem a toxicidade de quimioterápicos e, ao mesmo tempo, aumentam sua ação farmacológica. Emulsões lipídicas com composição semelhante aos quilomícrons tem potencial aplicabilidade para vetorização de AB. **OBJETIVO:** Avaliar a citotoxicidade *in vitro* da anfotericina B desoxicolato (AB) e sua associação à nanoemulsão lipídica, o quilomícron artificial (QMA-AB), e *in vivo*, a tolerabilidade e eficácia terapêutica no tratamento da leishmaniose tegumentar em camundongos BALB/c. **MÉTODOS:** Para os testes *in vitro*, foi determinada a concentração inibitória (IC₅₀) em formas promastigotas, a concentração citotóxica (CC₅₀) em macrófagos sem infecção e a taxa de macrófagos infectados quando tratados com as formulações QMA, AB e QMA-AB. Já para os testes *in vivo*, camundongos BALB/c foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com 2,5 mg/kg/dia de AB e 17,5 mg/kg/dia de QMA-AB e QMA. Durante o tratamento os animais foram monitorados semanalmente acerca do peso corporal e do diâmetro das patas. Ao término do tratamento os camundongos foram eutanasiados e amostras de sangue e tecido foram coletadas para análises bioquímicas, hematológicas,

histopatológicas e quantificação da carga parasitária por método molecular qPCR. A análise estatística foi realizada com teste ANOVA seguido de Bonferroni ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As variáveis categóricas foram reportadas em tabelas de contingência (teste exato de Fisher). As análises foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$. **RESULTADOS:** A formulação QMA-AB foi mais efetiva contra formas promastigotas apresentando IC_{50} em torno de $0,012 \mu\text{g/mL}$, enquanto que o IC_{50} de AB foi de $0,023 \mu\text{g/mL}$. AB foi mais tóxica para os macrófagos J744 com baixa concentração, $2,324 \mu\text{g/mL}$. QMA-AB foi menos tóxica para os macrófagos com CC_{50} de $8,106 \mu\text{g/mL}$, superior à AB, e apresentou alto índice de seletividade ($IS=675,5$). A formulação QMA-AB diminuiu a taxa de infecção em macrófagos, foi menos tóxica, mais eficaz no tratamento dos animais infectados e reduziu em torno de 60% o tamanho do diâmetro das lesões em relação à AB e 95% da carga parasitária. **CONCLUSÕES:** A associação QMA-AB apresentou-se como uma alternativa em potencial no tratamento da LT na busca de uma preparação de alta eficácia terapêutica, baixa toxicidade e baixo custo para o Sistema Único de Saúde.

Descritores: leishmaniose cutânea; anfotericina B; nanoemulsão lipídica; quilomícrons; reação em cadeia da polimerase em tempo real.

ABSTRACT

Souza RM. *Use of lipid nanoemulsion in the experimental treatment of cutaneous leishmaniasis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: American tegumentary leishmaniasis (ATL) is an infectious, non-contagious, vector-borne disease with heteroxenic cycle caused by parasites of the genus *Leishmania*. It is considered a polymorphic disease that affects skin and mucous membranes. Medications currently available for the treatment of the disease are unsatisfactory because of their limited effectiveness and side effects, and the high cost and resistance that protozoa accumulate against these drugs. Increased tolerability is critical to the overall success of treatment. The commercial lipid formulations of amphotericin B (AB), Ambisome[®], Abelcet[®] and Amphocil[®], presented as an advance in the treatment of (ATL). Lipid nanoemulsion systems reduce the toxicity of chemotherapeutics and, at the same time, increase their pharmacological action. Lipid emulsions with composition similar to chylomicrons have potential applicability for vectorization of AB. **OBJECTIVE:** This study evaluated the *in vitro* cytotoxicity of amphotericin B deoxycholate (AB) and its association with lipid nanoemulsion, artificial chylomicron (ACM), and *in vivo*, the tolerability and therapeutic efficacy in the treatment of cutaneous leishmaniasis in BALB/c. **METHODS:** For *in vitro* tests, the inhibitory concentration (IC₅₀) in promastigote forms, the cytotoxic concentration (CC₅₀) in non-infected macrophages and the rate of infected macrophages when treated with the ACM, AB and ACM-AB formulations were determined. For the *in vivo* tests, BALB/c mice were infected with *L. amazonensis* and treated with 2,5 mg/kg/day of AB and 17,5 mg/kg/day of ACM-AB and ACM. During the treatment the animals were monitored weekly about body weight and leg diameter. At the end of the treatment the mice were euthanized and blood and tissue samples were collected for biochemical, hematological, histopathological and quantitative analysis of the parasite load. Statistical analysis

was performed using ANOVA followed by Bonferroni or Kruskal-Wallis with Dunn post-test. Categorical variables were reported in contingency tables (Fisher's exact test). The analyzes were considered statistically significant at $p < 0.05$. **RESULTS:** The ACM-AB formulation was more effective against promastigote forms exhibiting IC_{50} around 0,012 $\mu\text{g/mL}$, while the IC_{50} of AB was 0,023 $\mu\text{g/mL}$. AB was more toxic to J744 macrophages with low concentration, 2,324 $\mu\text{g/mL}$. ACM-AB was less toxic to macrophages with CC_{50} of 8,106 $\mu\text{g/mL}$, higher than AB, and presented a high selectivity index ($IS = 675.5$). The ACM-AB formulation decreased the rate of macrophages infected, was less toxic, more effective in the treatment of infected animals and reduced the size of the lesion diameter by about 60% in relation to AB and 95% of the parasite load. **CONCLUSIONS:** The ACM-AB association was presented as a potential alternative in the treatment of ATL in the search for a high therapeutic efficacy, low toxicity and low cost preparation for the Unified Health System.

Descriptors: cutaneous leishmaniasis; amphotericin B; lipid nanoemulsion; chylomicrons; real-time polymerase chain reaction.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses: Aspectos Gerais

As leishmanioses são enfermidades causadas por várias espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanomastidae, gênero *Leishmania*, que acometem o homem e diferentes espécies de animais silvestres e domésticos (Mandell *et al.*, 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 350 milhões de pessoas em 88 países ao redor do mundo estão em áreas de risco de contrair a doença (WHO, 2009).

A leishmaniose apresenta inúmeras manifestações clínicas, a leishmaniose tegumentar (LT) classificada em três tipos: leishmaniose cutânea (LC), a mais comum; leishmaniose mucocutânea (LM), que pode se disseminar para a mucosa; e a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, a forma mais grave da doença, que pode ser fatal se não tratada adequadamente e pode ser disseminada para vários órgãos (Murray *et al.*, 2005; Shaw e Carter, 2014).

Em relação às espécies, em 1987, Laison e Shaw classificaram as principais espécies do gênero *Leishmania* em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*; sendo que no primeiro o protozoário se desenvolve no intestino anterior e médio do vetor enquanto que no segundo, o protozoário se desenvolve no intestino anterior, médio e posterior do vetor. Aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* foram descritas e destas, 31 espécies são conhecidas por serem parasitos de mamíferos e 20 espécies são patogênicas para seres humanos (Akhoundi *et al.*, 2016).

Os hospedeiros vertebrados das várias espécies de *Leishmania* incluem uma grande variedade de mamíferos, como roedores, marsupiais, edentados, canídeos, primatas e, entre estes, humanos (Anversa *et al.*, 2018).

As *Leishmanias* são organismos digenéticos, isto é, com dois estágios no ciclo de vida, um extracelular no organismo do hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) no qual apresenta formas alongadas e flageladas denominadas promastigotas e outro estágio intracelular no hospedeiro vertebrado (mamífero) com formas arredondadas ou ovaladas, flagelo curto e interiorizado, desprovidas de locomoção e núcleo arredondado, denominadas amastigotas (Grimaldi e Tesh, 1993; Bañuls *et al.*, 2007). Apresentam uma mitocôndria única (denominada cinetoplasto) rica em ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial, o DNA de cinetoplasto (kDNA) (Rodgers *et al.*, 1990).

No Novo Mundo, nas Américas, as leishmanioses são transmitidas entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebótomos (Ordem: Diptera, Família: Psychodidae, Subfamília: Phlebotominae) dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* enquanto que no Velho Mundo pertence ao gênero *Phlebotomus* (Claborn, 2010). Aproximadamente 700 espécies de flebotomíneos foram descritas, das quais cerca de 30 espécies são vetores comprovados de leishmaniose e mais de 40 espécies adicionais são vetores suspeitos (Akhoundi *et al.*, 2016; Anversa *et al.*, 2018).

Após a picada do flebótomo (Figura 1), as promastigotas metacíclicas são fagocitadas, principalmente por macrófagos, e o fagossomo formado ao redor dos parasitos sofre um processo de maturação e remodelação da membrana e forma uma nova organela, o vacúolo parasitóforo (VP). Dentro do VP, os promastigotas sobrevivem ao pH ácido e se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por um período de 4 a 6 dias até a erupção da célula do sistema fagocítico mononuclear, o

macrófago; infectando outras células. Com diferentes características de tropismo, os parasitos podem infectar células superficiais ou células viscerais. O ciclo de vida do parasito se completa quando o mosquito não infectado faz novo repasto de sangue do hospedeiro infectado (Shaw e Carter, 2014; Bruni *et al.*, 2017).

Fonte: Adaptado de dpd.cdc.gov (<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

Figura 1 - Ciclo biológico

No momento em que o macrófago entra em contato com *Leishmania*, ocorre a fagocitose mediante diversos receptores, sendo um deles o receptor de complemento (C3). Ao mesmo tempo, diversas moléculas presentes na superfície da promastigota, como a metaloprotease Gp63, encontrada em abundância, e o lipofosfoglicano (LPG) ligam-se a receptores *toll-like* gerando uma resposta intracelular que leva a produção de citocinas inflamatórias (Tuon *et al.*, 2008a). A produção preponderante de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) por subpopulações de linfócitos T CD4⁺ de perfil Th1, seria essencial para a resolução da doença; por outro lado, uma

resposta predominantemente do tipo Th2, com a presença de interleucinas (IL), IL 4, IL 10 e TGF- β , resultaria em enfermidade de maior gravidade (Marzochi *et al.*, 1997).

1.2 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar é a forma mais comum da doença com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas pelo parasito em todo mundo (WHO, 2009). Cerca de 95% dos casos de LT ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central (Figura 2). Cerca de 0,7 milhão a 1,2 milhões de novos casos da doença ocorrem anualmente em todo o mundo. Mais de dois terços dos casos novos de LT ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria (Anversa *et al.*, 2018).

Fonte: http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png

Figura 2 - Situação da endemicidade da leishmaniose cutânea, 2013

1.3 Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LT é uma doença polimorfa de pele e/ou mucosa causada pelas *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) shawi* (Shaw e Laison, 1975; Laison e Shaw, 1987).

1.3.1 Leishmaniose cutânea localizada

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) tem um período de incubação que normalmente varia de 2 a 4 semanas, mas pode variar de alguns dias a 3 anos (Handler *et al.*, 2015). É definida pela presença de lesão ulcerada com bordas elevadas em moldura com fundo granuloso, com ou sem exsudação. Em geral, essas úlceras são indolores e apresentam poucos parasitos e a imunidade celular do paciente é preservada, incluindo uma forte resposta de células T, com predomínio de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e IL-12) (Scott e Novais, 2016).

1.3.2 Leishmaniose mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea (LMC) leva à destruição parcial ou total das membranas da mucosa nasofaríngea. Na América do Sul, quase 90% dos casos de LMC ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (Alvar *et al.*, 2012; Handler *et al.*, 2015).

Acredita-se que essa forma clínica da leishmaniose é causada por disseminação dos parasitos via hematogênica ou linfática e geralmente ocorre meses ou anos após a cicatrização da lesão cutânea (Amato *et al.*, 2007; Daneshbod *et al.*, 2011) podendo apresentar lesões mucosa e cutânea concomitantemente. *L. braziliensis* é a espécie envolvida na maioria dos casos de leishmaniose

mucocutânea, mas *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* também foram implicadas (Strazzulla *et al.*, 2013; Handler *et al.*, 2015). Os sintomas e sinais mais precoces da leishmaniose mucosa são obstrução nasal, epistaxe e o estabelecimento de granuloma no septo nasal anterior. O paciente pode apresentar coriza e, em poucos dias ou meses, pode ocorrer perfuração do septo. A pele do nariz torna-se espessa, edemaciada e hiperemiada, acarretando aumento de volume da pirâmide nasal comprometendo sua estrutura, o lábio superior, palato, laringe, faringe e traqueia, provocando grandes deformidades com mutilações e podendo ocasionar a morte do paciente por aspiração ou insuficiência respiratória (Amato *et al.*, 1995; Lessa *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2017; Tuon *et al.*, 2018). Imunologicamente, a leishmaniose mucosa é caracterizada por uma resposta imune celular específica alta, Th1 e Th2. Nesses casos, há altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) e IL-4 e diminuição dos níveis de IL-10 e TGF- β , o que explica a destruição crônica e grave dos tecidos e a escassez de parasitos nas lesões (Amato *et al.*, 2003).

1.3.3 Leishmaniose difusa

A forma menos comum da LT é leishmaniose cutânea difusa (LCD) situada no polo anérgico da doença, em oposição à forma polar resistente representada pela LM e parte das LCL. As lesões, via de regra, não cicatrizam espontaneamente e são classicamente rebeldes ao tratamento medicamentoso.

Geralmente, muitos parasitos são encontrados nas lesões e o perfil de citocinas dos pacientes é predominantemente do tipo Th2, com baixa produção de IFN- γ e altos níveis de IL-4 e IL-10. Como regra geral, as lesões nodulares não se curam espontaneamente e são resistentes aos tratamentos disponíveis (Kevric *et al.*, 2015).

1.3.4 Leishmaniose disseminada

A leishmaniose disseminada (LD) é caracterizada por lesões múltiplas, geralmente ulceradas e podem ser muito numerosas, mas respondem ao tratamento medicamentoso habitual. Na forma disseminada a imunidade celular é usualmente preservada como evidenciado pela positividade da intradermorreação de Montenegro. Os parasitos nas lesões são raros e a resposta imune é bastante variada. Parece haver uma inibição incompleta das células T, embora exista uma evidente supremacia da resposta Th1 sobre Th2 (Silveira *et al.*, 2009).

1.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da LT, além dos aspectos epidemiológicos e clínicos, abrange também o diagnóstico laboratorial (Gontijo *et al.*, 2003). A investigação do parasito pode ser feita por meio de escarificação, biópsia, *imprint* e punção aspirativa, geralmente realizada na borda da lesão. Estas são técnicas rápidas e baratas, embora tenham sensibilidade limitada especialmente em lesões crônicas (Von Stebut, 2015).

O diagnóstico de certeza, com encontro do parasito, pode ser possível por meio de pesquisa direta por aposição de tecido em lâmina corada com Giemsa ou Panótico Rápido, cultura em meio bifásico específico (NNN-Novy, McNeal, Nicolle/BHI ou Schneider[®] suplementado com antibióticos e soro fetal bovino-SFB-*Sigma*) e exames histopatológicos.

Os exames imunológicos, como intradermorreação de Montenegro (IDRM) e imunofluorescência indireta (IFI), são métodos indiretos que também auxiliam na definição diagnóstica (Murbach *et al.*, 2011). A IDMR fundamenta-se na resposta de hipersensibilidade celular retardada, podendo ser negativa nas primeiras quatro a seis

semanas após o surgimento da lesão cutânea. Após esse período, a IDRM costuma ser positiva em mais de 90% dos pacientes. Em pacientes não infectados pode apresentar uma pequena reação inflamatória ou estar ausente (Ministério da Saúde, 2017). Geralmente o teste é considerado negativo se a área do inóculo estiver apenas avermelhada porém não endurecida e for inferior a 5 mm após 48 horas decorridas da aplicação. Recentemente, a técnica ELISA realizada com uma proteína de choque térmico recombinante *L. infantum* 83 (rHsp83) representa um ensaio sorológico de confirmação de rotina para o diagnóstico de LC, LMC e LV (Celeste *et al.*, 2014).

No entanto, os testes sorológicos não são comumente usados em casos de LC, devido às taxas variáveis de sensibilidade e especificidade e níveis reduzidos de anticorpos, especialmente em casos de LCL (Von Stebut, 2015; Anversa *et al.*, 2018).

Paralelamente, podem ser utilizados métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações. Atualmente o método de PCR em tempo real (qPCR *Real Time*) tem sido utilizado tanto para identificação das espécies do parasito como para quantificar a carga parasitária monitorando o tratamento e testes de eficiência das drogas (Gontijo *et al.*, 2003; Schönián *et al.*, 2011). Apesar de ser amplamente utilizado para fins de pesquisa, não é utilizado com frequência na rotina diagnóstica, pois, além do alto custo, a técnica exige padronização, infraestrutura laboratorial e rigor técnico (Kevric *et al.*, 2015).

1.5 Diagnóstico Diferencial

Inúmeras lesões cutâneas decorrentes de outras doenças podem mimetizar aspectos clínicos e epidemiológicos comuns à leishmaniose (Anversa *et al.*, 2018).

Nas lesões cutâneas, devem ser excluídas as úlceras traumáticas, as úlceras de estase, piodermites, infecções fúngicas (paracoccidioidomicose, esporotricose, cromomicose), neoplasias cutâneas, sífilis e tuberculose cutânea. A hanseníase virchowiana deverá ser excluída, principalmente no diagnóstico diferencial da leishmaniose cutânea difusa. Nas lesões mucosas, o diagnóstico diferencial deve ser feito com a paracoccidioidomicose, hanseníase virchowiana, rinoscleroma, boubas, sífilis terciária, granuloma médio facial e neoplasias (Gontijo *et al.*, 2003; Tuon *et al.*, 2008b).

1.6 Tratamento

É importante ressaltar que vários fatores estão implicados no sucesso do tratamento tais como: como genética do hospedeiro, resposta imune e apresentação clínica da doença; recursos de tratamento, como qualidade do medicamento, dosagem e duração e conclusão da terapia; características do parasito, como sensibilidade intrínseca da espécie e falta de resistência à medicação (Sundar e Singh, 2016).

Como a leishmaniose é uma doença negligenciada, o desenvolvimento de novas drogas não provoca o mesmo interesse comercial como de outras doenças. No entanto, esforços para o combate das doenças negligenciadas estão sendo feitos por organizações não governamentais, indústria farmacêutica, pesquisa, governo e organizações filantrópicas com o comprometimento de controlar, eliminar ou erradicar 10 doenças até 2020, inclusive a leishmaniose, e melhorar a vida de mais de um bilhão de pessoas, como relatado na *London Declaration on Neglected Tropical Diseases* (Reithinger *et al.*,

2007; Amato *et al.*, 2011; Shaw e Carter, 2014). Assim como outras doenças tropicais, são necessários mecanismos e ferramentas adicionais de controle, como drogas, vacinas, diagnósticos confiáveis, agentes de controle de vetores e estratégias de controle para erradicar a infecção (Hotez *et al.* 2016; Ahmad *et al.*, 2016).

Os medicamentos, atualmente disponíveis para o tratamento da doença, são insatisfatórios devido à sua eficácia limitada e seus efeitos colaterais, além do alto custo e a resistência que os protozoários acumulam contra essas drogas (Ayres *et al.*, 2008; Musa *et al.*, 2010; Chakravarty e Sundar , 2010).

Historicamente, a quimioterapia para tratar a leishmaniose tem sido baseada na administração parenteral de antimoniais pentavalentes (Amato *et al.*, 2009). Esses fármacos apresentam uma eficácia de aproximadamente 90%, mas há evidências de que a eficácia pode variar de acordo com a espécie, região geográfica, presença de cepas resistentes e esquemas terapêuticos empregados (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015).

A droga de primeira escolha para tratamento de casos de LT é o antimoniatado de N-metil glucamina (Glucantime®). Segundo a OMS, a dose do Glucantime® deve ser calculada em mg/Sb⁺⁵/Kg/dia, Sb⁺⁵, significando antimônio pentavalente. A dose para tratamento deve ser calculada baseando-se no conteúdo de Sb⁺⁵ em cada ampola, nunca ultrapassando a dose de três ampolas/dia, ou seja, 15 mL/dia.

Embora ainda considerada droga de primeira escolha os antimoniais pentavalentes apresentam efeitos colaterais expressivos. A aplicação dos antimoniais deve ser por via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV) (Amato, 2006).

Os antimoniais interferem na bioenergética das formas amastigotas do parasito, inibindo a atividade glicolítica e a via oxidativa dos ácidos graxos, com consequentes reduções na produção de ATP e na biossíntese molecular (Anversa *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, o surgimento de resistência do parasito aos antimoniais pentavalentes limitou o tratamento em vários países. Foram observadas falhas no tratamento tanto na leishmaniose visceral (Sundar e Singh, 2016) como na leishmaniose tegumentar (Tuon *et al.*, 2008b), sendo que um dos fatores que certamente contribuíram para o aumento da resistência é o uso generalizado do medicamento como dosagens insuficientes, terapias irregulares e incompletas (Anversa *et al.*, 2018).

No caso de resposta insatisfatória ou impossibilidade de administração, a anfotericina B desoxicolato (AB) e a pentamidina são os fármacos de segunda escolha. As principais limitações que envolvem o uso da pentamidina estão relacionadas a seus efeitos colaterais como cefaleia, náusea, dor abdominal, hipoglicemia, taquicardia, insuficiência renal em 25% dos pacientes (geralmente reversíveis) e pancreatite que pode levar ao aparecimento de diabetes mellitus em 10% a 15% dos casos. Portanto, a pentamidina é contraindicada em casos de gravidez, diabetes mellitus, insuficiência renal, insuficiência hepática, doença cardíaca e em crianças com peso inferior a 8 kg (Ministério da Saúde, 2017; Anversa *et al.*, 2018).

AB é um antibiótico poliênico, utilizado em infecções fúngicas, produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, tendo sido isolada em meados de 1955. AB interage especificamente com o ergosterol, esteroide constituinte da parede celular dos fungos, levando à formação de poros alterando a permeabilidade e permitindo, portanto, o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, levando eventualmente à morte celular (Bolard *et al.*, 1993; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015).

Foi relatado que AB age sobre as células do sistema imune, exercendo efeitos moduladores nas propriedades dos leucócitos, inibição da quimiotaxia, na produção de anticorpos, diminuição da fagocitose e destruição de *Candida albicans* (Filippin *et al.*, 2006).

A estrutura química de AB (Figura 3) é constituída por uma molécula de 37 átomos de carbono formando um anel com uma cadeia de duplas ligações conjugadas e na porção oposta uma cadeia poli-hidroxilada com sete grupos hidroxila livres, conferindo sua característica anfipática ou anfifílica, isto é, possui uma região solúvel em meio aquoso (hidrofílica) e uma região insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos e lipídios (hidrofóbica) (Filippin *et al.*, 2006).

Figura 3 - Estrutura química da anfotericina B

Em relação à farmacocinética, em adultos são encontrados picos médios de concentração plasmática variando de 0,5 µg/mL a 2µg/mL quando recebem doses repetidas de aproximadamente 0,5 mg/kg/dia de AB.

Uma meia-vida de eliminação de aproximadamente 15 dias segue-se após uma meia-vida plasmática de eliminação inicial de cerca de 24 horas. AB é excretada

de forma lenta pelos rins, sendo que 2% a 5% de uma dose administrada é eliminada sob a forma biologicamente ativa. Após a suspensão do tratamento a droga pode ser detectada na urina durante um período de 3 a 4 semanas, devido à eliminação lenta, alcançando maiores concentrações no fígado, baço, rins e pulmões. A fração circulante, cerca de 95% da qual se liga a proteínas, colesterol e hemácias, tem seu nível reduzido lentamente, possibilitando que o antibiótico seja administrado, na fase de consolidação do tratamento, em intervalos de 48 a 72 horas. Deve-se atingir as seguintes doses acumuladas de AB para o tratamento da LT: formas cutâneas 1 g e na forma mucosa e cutaneomucosa, 2,5 g a 3 g (Amato, 2006). A principal via de excreção da AB é a renal, mas há também eliminação por via hepatobiliar, a qual presume-se que parte da droga seja metabolizada. Os efeitos adversos mais comuns são a nefrotoxicidade e a anemia, que requerem correção das doses e dos intervalos de administração e, eventualmente, obrigam à suspensão da terapia. Outras reações adversas podem ser encontradas como a plaquetopenia, dispneia, hipotensão arterial, arritmia cardíaca e toxicidade neurológica, além de tromboflebite no local de aplicação (Martinez *et al.*, 2006).

Entre as alterações histopatológicas causadas pela AB estão lesões glomerulares que incluem espessamento ou fragmentação das membranas basais, hiper celularidade, fibrose, hialinização tubular, atrofia do ramo ascendente da alça de Henle e túbulos contorcidos distais, além de nefrocalcínose (depósito de cálcio no parênquima ou túbulos renais) (Bagnis e Deray, 2002). Os níveis séricos de sódio, potássio, magnésio, ureia e creatinina devem ser medidos duas vezes por semana e um hemograma completo e um eletrocardiograma também devem ser realizados (Amato *et al.*, 2007).

A miltefosina é o único medicamento de uso oral disponível para o tratamento da leishmaniose, embora esteja sob estudos, até o momento não é utilizada em muitos países devido à teratogenicidade (Mosimann *et al.*, 2018).

1.6.1 Monitoramento do tratamento

Além dos aspectos clínicos, após o tratamento, a quantificação da carga parasitária é de grande valia. A quantificação pelo ensaio de microdiluição limitante requer o cultivo do parasito, mas sua execução apresenta algumas limitações devido às dificuldades associadas à manutenção da cultura, além de ser extremamente demorado e laborioso (Bretagne *et al.*, 2001) podendo levar semanas para concluir os resultados (Antonia *et al.*, 2018).

Avanços recentes que empregam a manipulação genética de parasitos para expressar moléculas repórteres vivas, como a luciferase, permitem o monitoramento do parasito em tempo real durante um longo período de tempo; no entanto, há necessidade equipamentos caros para visualização (Roy *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2011; Calvo-Alvarez *et al.*, 2012; Reimão *et al.*, 2013; Antonia *et al.*, 2018).

A reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*) PCR é um método molecular que permite amplificar em escala exponencial sequências de DNA. Dotada de alta sensibilidade, é capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma do DNA de uma *Leishmania*, o equivalente a 1/10 do parasito. Entretanto, as exigências técnicas e o custo relativamente elevado ainda limitam seu emprego rotineiro. Pode apresentar uma sensibilidade de 98,41% e especificidade de 95,59% no diagnóstico da LT (Gontijo *et al.*, 2003). Dos métodos moleculares, a qPCR-*Real Time* é sensível e tem potenciais aplicações para o diagnóstico e

discriminação de espécies, bem como novas abordagens para determinar a carga parasitária e resposta pós-tratamento em seres humanos infectados.

Na qPCR *Real Time*, são empregados corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Um corante bastante utilizado é o *Sybr Green* que se liga inespecificamente às fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Trata-se de uma cianina assimétrica que não emite fluorescência quando livre em solução, mas ligada a moléculas de DNA emite um forte sinal luminoso (Nygren *et al.*, 1998). No início da década de 90 estudos passaram a explorar a atividade exonucleásica da *taq polimerase* para o desenvolvimento de sondas *TaqMan* (Holland *et al.*, 1991), que é outra forma de gerar fluorescência dirigida especificamente à uma região interna da sequência que se deseja amplificar, porém esse método é oneroso. Recentemente, vários esforços foram feitos para padronizar protocolos de laboratório para detecção e quantificação de parasitos de isolados clínicos (Cruz *et al.*, 2013; Leon *et al.*, 2017).

1.7 Nanopartículas

Na busca duradoura por melhores agentes leishmanicidas, a nanobiotecnologia está ganhando um imenso interesse no desenvolvimento de materiais em nanoescala que atraíram atenção significativa no campo da medicina (Ahmad *et al.*, 2016).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) “nano” é qualquer produto com propriedades ou fenômenos atribuíveis às suas dimensões nanométricas mesmo que essas dimensões caiam fora da faixa nanométrica de 1 nm a 100 nm (Vert *et al.*, 2012 -

FDA, 2014, Zazo *et al.*, 2016). As aplicações na medicina vão desde o uso de nanomateriais para dispositivos médicos, até o uso de nanopartículas (NPs) como agentes terapêuticos, sistemas de liberação de drogas e sistemas de imagem diagnóstica. Foram investidos nos últimos anos, bilhões de dólares no mercado mundial de NPs nas ciências da vida (Bamrungsap *et al.*, 2012).

Zazo *et al.* (2016) relataram a classificação dos diferentes tipos e características das nanopartículas usados para distribuição de drogas ao alvo, seguido por uma revisão de pesquisas atuais e ensaios clínicos com o uso de nanopartículas no campo das doenças infecciosas, das quais incluem nanopartículas orgânicas (lipossomas, NPs poliméricas, micelas poliméricas, NPs sólidas, nanopartículas inorgânicas (NPs de ouro, NPs de prata, entre outras). NPs oferecem tratamentos promissores para doenças infecciosas, aumentam o efeito de drogas, ao mesmo tempo, podem permitir menor dosagem, melhores intervalos de administração, melhor biodisponibilidade e reduzir os efeitos adversos. Contudo, elas também têm desvantagens. Ainda há pouco conhecimento sobre o metabolismo, depuração, toxicidade das NPs, a natureza dos alvos ideais de certas infecções e os níveis ideais de drogas para a atividade terapêutica no local de destino dos patógenos.

1.7.1 Emulsões Lipídicas

As drogas leishmanicidas devem atravessar várias membranas a fim de alcançar o parasito. Uma vez no local da infecção, qualquer medicamento deve primeiro permear a membrana infectada de macrófagos antes de cruzar a membrana do VP e, finalmente, atravessar a membrana plasmática do parasito (Shaw e Carter, 2014). A afinidade de AB por colesterol vem sendo há muito tempo estudada, tanto

em modelos celulares como em membranas lipossômicas. Assim, embora a AB possua maior afinidade por ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultados da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos. Neste contexto, as formulações lipídicas da AB apresentaram-se como um avanço no tratamento da LT e foram nos últimos anos a única opção terapêutica comprovadamente útil no tratamento desta enfermidade, especialmente nos indivíduos com contraindicações ou comorbidades que impedem o uso dos antimoniais pentavalentes ou outras drogas de segunda escolha como o isotionato de pentamidina (Amato *et al.*, 2000 e 2011).

O índice terapêutico de AB apresentou uma melhora significativa com as formulações lipídicas de AB e demais estratégias tecnológicas, permitindo o uso de doses maiores por kg de peso com aparente redução da toxicidade renal. Três formulações lipídicas foram desenvolvidas pela indústria farmacêutica:

- Ambisome[®]: formulação de vesículas unilamelares pequenas constituídas de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) e AB em razão molar de 2:1:0,8:0,4 (AmBisome[®], Fujisawa Healthcare Inc., Deerfield, IL), aprovada pelo FDA em 1997. Esta formulação lipídica tem sido utilizada no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea (Guery *et al.*, 2017) e mucosa (Rocio *et al.*, 2014).
- ABCD: dispersão coloidal de AB em sulfato de colesisterila sódica em razão molar de 1:1, formulada em partículas discoides (Amphocil[®], Sequus-pharmaceuticals Inc., Menlo Park, CA, EUA), aprovada pelo FDA em 1996.

- ABLC complexo lipídico com AB de estrutura multilamelar *ribbon-like* constituído de diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e DMPG em razão molar de 7:3 com 36 mol% de AB (Abelcet[®], The Liposome Company Inc., Princeton, NJ) licenciada no Reino Unido e aprovada pelo FDA em 1995 (Filippin *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.* 2014).

Estas formulações lipídicas são de difícil preparação e o desenvolvimento industrial torna-se importante, porém o custo é elevado em relação a terapia convencional.

Embora a AB lipossomal seja atualmente aceita como um tratamento efetivo de primeira escolha para LT, o regime de dosagem ideal é indefinido e o alto custo (de 126 a 250 dólares) em relação ao Fungizone (30 dólares para um tratamento de 30 dias) é uma importante desvantagem para os Sistemas de Saúde dos países em desenvolvimento (Amato *et al.*, 2011; Tuon *et al.*, 2018; Bruni *et al.*, 2017).

A veiculação de fármacos no sistema de nanopartículas ricas em colesterol em experiências no campo da Nanotecnologia aplicada às Ciências Médicas realizadas pelo grupo liderado pelo Prof. Raul Maranhão, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, mostrou que nanoemulsões sólidas manufaturadas em laboratório podem concentrar-se em tumores malignos e em tecidos com processos inflamatórios após injeção na corrente sanguínea (Maranhão *et al.*, 1993; Valduga *et al.*, 2003). Em outros experimentos, foi relatado que as nanoemulsões concentram-se também nas artérias com lesões ateroscleróticas (Padoveze *et al.*, 2009) e em outros processos inflamatórios induzidos em animais, como o da artrite reumatoide e no coração transplantado em coelho (Stolf *et al.*, 2011).

Marzzullo *et al.* (1977) observaram uma redução na inibição do *burst* oxidativo de polimorfonucleares (PMN) quando AB foi associada a uma emulsão de composição semelhante aos quilomícrons naturais da linfa.

1.7.1.1 Quilomícrons

Os quilomícrons naturais se formam nas células intestinais a partir dos lipídios que absorvemos na dieta (Figura 4) e têm a função de transportar os ácidos graxos para os tecidos em que serão consumidos ou armazenados como combustíveis.

Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/talipoproteina.html>

Figura 4 - Produção de quilomícrons por uma célula intestinal

Como toda lipoproteína, as partículas dos quilomícrons naturais são envoltas por uma monocamada de fosfolípidos e medem em torno de 1000 nm (Figura 5). O núcleo dessas partículas é composto predominantemente de triglicérides, que

constituem por volta de 90% do peso total da lipoproteína, conferindo sua baixa densidade. O tamanho das lipoproteínas é inversamente proporcional à densidade, quanto maior o tamanho, menor a densidade.

Figura 5 - Classificação das lipoproteínas plasmáticas

Os quilomícrons artificiais consistem numa emulsão lipídica sem apolipoproteína (proteína que se liga aos lipídeos). Emulsões lipídicas que mimetizam a composição dos quilomícrons se comportam metabolicamente como os quilomícrons linfáticos nativos quando injetados na corrente sanguínea (Redgrave *et al.*, 1985; Maranhão *et al.*, 1996).

Similarmente aos quilomícrons nativos, os quilomícrons artificiais sofrem destruição dos triglicerídeos pela lipoproteína lipase na superfície endotelial das arteríolas e as partículas de lipoproteínas degradadas resultantes, denominadas remanescentes de quilomícrons, são retomadas pelo fígado. Esta tem sido uma abordagem para investigar o metabolismo do quilomícron utilizado em muitos estudos clínicos de pacientes com doença cardiovascular, reumática, hipertensão e transplante de órgãos (Sposito *et al.*, 2004; Bernardes-Silva *et al.*, 1995; Borba *et al.*, 2000; Vinagre *et al.*, 2000).

Experiências prévias realizadas mostraram que AB, um composto de toxicidade elevada, principalmente nefrotoxicidade, pode associar-se de maneira quimicamente estável às emulsões lipídicas, como foi demonstrado com vários quimioterápicos, como carmustina, paclitaxel, etoposídeo e daunorrubicina (Maranhão *et al.*, 2002; Sposito *et al.*, 2004).

As nanoemulsões têm meia-vida prolongada e são capazes de transportar os fármacos associados a elas no interior dos macrófagos e melhorar a efetividade terapêutica dos mesmos. Tendo em vista essas observações prévias, uma formulação consistindo na associação da anfotericina à nanopartícula lipídica artificial semelhante ao quilomícron, pode apresentar-se como uma alternativa em potencial no tratamento da LT na busca de uma preparação de alta eficácia terapêutica, baixa toxicidade e baixo custo para o Sistema Único de Saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a tolerabilidade e eficácia da anfotericina B desoxicolato associada à nanopartícula lipídica artificial semelhante ao quilomícron (QMA-AB) no tratamento experimental da leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a toxicidade das formulações, QMA, AB e QMA-AB contra formas promastigotas, macrófagos J774 infectados ou não com *Leishmania (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269.

- Determinar a toxicidade e a dose tolerada máxima em grupos de camundongos saudáveis tratados com doses crescentes de AB e QMA-AB a partir da dose recomendada (2 mg/kg/dia).

- Investigar, em camundongos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*, se uma preparação que consiste na associação de anfotericina associada à nanopartícula lipídica artificial QMA-AB é capaz de resolver o processo infeccioso, tendo como base comparativa um grupo-controle com infecção tratado com QMA sem AB.

- Investigar possíveis alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas dos camundongos tratados com AB e QMA-AB.

- Quantificar a carga parasitária das lesões das patas dos camundongos utilizando qPCR *Real Time*.

3 MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPEsq) e pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo CEUA-IMTSP, protocolo nº425/12 relacionado ao projeto CNPq (processo nº 479291/2012-8) e protocolos nº 327A e 325A vinculados ao projeto FAPESP (processo 2015/10038-0).

3.2 Modelo Experimental

O estudo foi realizado com camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, (*Mus Musculus*) suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* (McElrath *et al.*, 1987), machos, com peso de 20 g a 24 g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os camundongos foram alocados em grupos de cinco animais por gaiola com maravalha, onde receberam água, alimentação e condições controladas de luminosidade respeitando as normas éticas em experimentação animal. Durante os experimentos os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo- USP.

3.3 Amostras

Foram utilizadas amostras de sangue, soro e tecido cutâneo provenientes de modelos experimentais, camundongos BALB/c, infectados por *Leishmania (L.) amazonensis*.

3.4 Parasitos

As cepas referência utilizadas no estudo (Quadro 1) foram cedidas pelo Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia e Laboratório Micologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP.

Quadro 1 - Cepas referência utilizadas nos testes de especificidade do *primer*

Espécies	Código Internacional	Procedência
<i>L.(L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/1973/M2269	*CLIIOC
<i>L.(V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903	CLIIOC
<i>L.(L.) chagasi</i>	MHOM/BR/1974/PP75	CLIIOC
<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147	CLIIOC
<i>L.(V.) lainsoni</i>	MHOM/BR/1981/M6426	CLIIOC
<i>L. naiff</i>	MHOM/BR/1981/M6426	CLIIOC
<i>L. shawii</i>	MCEB/BR/1984/M8408	CLIIOC
<i>T. cruzi</i>	_____	LIM Parasitologia
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	_____	LIM Micologia
<i>Histoplasma capsulatum</i>	_____	LIM Micologia

*CLIIOC: Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz

3.4.1 Purificação das formas amastigotas de *L. amazonensis*

As formas amastigotas foram obtidas a partir do coxim plantar de dois camundongos BALB/c previamente infectados com *L. amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269. Após 45 dias de infecção, os animais foram eutanasiados por inalação de dióxido de carbono (CO₂). As patas foram decepadas e submersas em álcool iodado 70% para descontaminação e posterior remoção da pele das patas necrosadas. A seguir, o restante do tecido foi dilacerado, colocado em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) (*Sigma Aldrich*) e filtrado em gaze estéril. O filtrado foi passado em agulha fina de quatro a cinco vezes para romper as células e liberar as formas amastigotas. Posteriormente a suspensão foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm em centrífuga refrigerada 4° C por duas vezes. O *pellet* foi desprezado e o sobrenadante, rico em amastigotas, centrifugado a 4000 rpm por 30 minutos por duas vezes. O *pellet* final foi ressuspenso com 5 mL do meio e as amastigotas foram contadas em câmara de Neubauer (Barbiéri *et al.*, 1993). Uma alíquota foi reservada para infectar os animais e o restante inserido em meio de cultura 199 (*Sigma-Aldrich*) pH 7,2 para a propagação das formas promastigotas.

3.4.2 Cultivo das formas promastigotas de *L. amazonensis*

As promastigotas propagadas a partir da purificação de amastigotas foram criopreservadas em nitrogênio líquido para posterior utilização nos testes *in vitro*. Após o descongelamento, as promastigotas foram cultivadas novamente em garrafas de cultura celular de 25 cm² (*Jet-Biofil*) contendo 5 mL de meio de cultura 199 (*Sigma-Aldrich*) pH 7,2, e suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado

(SFB-LGC Biotecnologia), 2% de urina humana estéril, 100 UI/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (*Sigma-Aldrich*) e mantidas em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD) a 26°C.

3.5 Cultivo de Macrófagos Murinos Linhagem J774

As células tumorais, macrófagos J774, foram fornecidas pelo Instituto Butantan (São Paulo) e congeladas em nitrogênio líquido até o momento do uso. Após o descongelamento, em temperatura ambiente, os macrófagos J774 foram transferidos para um tubo cônico para a remoção do dimetilsulfóxido (DMSO) e ressuspensos com 10 mL de meio RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich*) suplementado com L-glutamina, 10% de soro fetal bovino (SFB), bicarbonato de sódio, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm por duas vezes. O sobrenadante foi decantado, o *pellet* ressuspensado com 5 mL de meio RPMI 1640 e 2,5 mL dessa suspensão foram transferidos para duas garrafas de cultura. Essas garrafas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por 48 horas para aderência. Após esse período, o tapete de células formado foi raspado com auxílio de um *scrap* e a suspensão transferida para outra garrafa de 75 cm² completando o volume para 20 mL para expandir as células. A garrafa foi mantida também em estufa a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por 48 horas para aderência. Após esse período, os macrófagos aderidos à garrafa foram raspados novamente e contados em câmara de Neubauer com corante vital *Trypan Blue* e utilizados nos testes de citotoxicidade e taxa de infecção.

3.6 Formulações

3.6.1 Anfotericina B desoxicolato

A anfotericina B desoxicolato UNIANF[®] foi hidratada com 10 mL de água de injeção segundo recomendação do fabricante (União Química, São Paulo, Brazil) resultando na concentração de 5 mg/mL.

3.6.2 Anfotericina desoxicolato associada ao quilomícron artificial (QMA)

A nanoemulsão rica em triglicérides, QMA, foi preparada com 193 mg de fosfatidilcolina, 50 mg de oleato de colesterol, 574 mg de trioléina e 16 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio: metanol (2:1) (Hirata *et al.*, 1987; Souza *et al.*, 1993). Os solventes residuais foram então evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecados a vácuo, por 16 horas, a 4°C. Após a adição de 25 mL de água para injeção, a mistura de lípides foi emulsificada por irradiação ultrassônica (Branson Ultrasonics, Danbury, EUA), durante 2 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 45°C a 50°C. Para o preparo da associação QMA-AB, AB foi acrescentada à mistura de lípides na razão 15:1 em massa de lípides:fármaco. O tamanho médio das partículas foi de 100 nm, medido pelo método de espalhamento de luz dinâmico (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern, Reino Unido). Os quilomícrons artificiais foram esterilizados em filtro Millipore 0,22 µm. A taxa de associação da AB ao QMA foi determinada através de quantificação por HPLC (Shimadzu LC10A, Shimadzu, Japão).

3.7 Ensaio *In Vitro*

A citotoxicidade celular foi avaliada em formas promastigotas e em macrófagos J774 pelo método colorimétrico MTT que consiste na incorporação da substância hidrossolúvel Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT) (*Sigma Aldrich*) em células viáveis que, por sua vez, reduzem o composto através da ação de desidrogenases mitocondriais formando cristais de formazan insolúveis e de coloração roxa que se depositam no citoplasma (Figura 6). A quantidade destes cristais é diretamente proporcional ao número de células viáveis. A leitura das densidades óticas (D.O.) dos testes foi realizada em espectrofotômetro de placas (*MultiSkan Go-Thermo Scientific*) com filtro 570 nm (Sieuwerts *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2013).

A citotoxicidade foi calculada baseada na seguinte fórmula:

$$\% C = 100 - \frac{\text{D.O. das células tratadas} \times 100}{\text{D.O. das células sem tratamento}}$$

Figura 6 - Visualização microscópica do teste MTT: (1) macrófagos J774 não tratados, (2) macrófagos J774 viáveis após tratamento com formação dos cristais de formazan e (3) macrófagos J774 não viáveis após tratamento sem formação de cristais de formazan

3.7.1 Determinação da concentração inibitória IC₅₀ das formulações QMA, AB e QMA-AB em formas promastigotas pelo método colorimétrico MTT

A reação foi realizada em placa de 96 poços de fundo chato e 100 µL contendo 100 µg das formulações foram distribuídos no primeiro poço e os demais poços receberam meio RPMI isento de fenol e antibióticos. Foram realizadas diluições seriadas das formulações QMA, AB e QMA-AB nas concentrações de 100 a 0,00075 µg/mL e as promastigotas cultivadas, como descrito anteriormente, foram contadas em câmara de Neubauer 1:100 em solução de formalina a 4% e 1×10^6 formas foram distribuídas nos poços. Para o controle negativo foram utilizadas as formulações com meio RPMI 1640 também sem fenol, sem parasitos e para o controle positivo, parasitos sem as formulações. As placas foram incubadas a 26°C em estufa B.O.D por 24 horas. Após esse período, adicionou-se 25 µL do MTT (5 mg/mL) em cada poço. As placas foram incubadas novamente por 4 horas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Para finalizar, foram adicionados 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% em todos os poços para posterior leitura no espectrofotômetro de placas com filtro 570 nm.

3.7.2 Alterações estruturais das formas promastigotas (microscopia eletrônica de transmissão [MET])

As formas promastigotas de cultura foram tratadas com a concentração inibitória (IC₅₀) obtida para cada formulação após 24 horas de incubação. Após esse período, as formas promastigotas foram capturadas, centrifugadas e o *pellet* ressuspenso em glutaraldeído para posterior processamento e análise das alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão- MET (JEOL 1010).

3.7.3 Determinação da concentração citotóxica CC_{50} das formulações QMA, AB e QMA-AB em macrófagos murinos linhagem J774 pelo método colorimétrico MTT

Após a aderência dos macrófagos J774 nas garrafas como descrito anteriormente, item 3.5, o meio da garrafa foi desprezado para remoção das células não aderidas e um novo meio adicionado. Os macrófagos foram raspados, a suspensão centrifugada e o sobrenadante descartado. O *pellet* obtido foi ressuspenso com meio e 10 μ L da suspensão foi submetida a contagem em câmara de Neubauer na ordem 1×10^7 células/mL. A quantidade de células foi ajustada para 1×10^5 em 100 μ L por poço e incubado em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período, o meio foi removido e os poços foram lavados com meio RPMI 1640 sem antibióticos e sem fenol. Foram adicionados 100 μ L das formulações QMA, AB e QMA-AB em concentrações decrescentes, de 100 a 0,00075 μ g/mL, exceto no controle que recebeu volume igual de meio RPMI sem antibióticos e sem fenol. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período, adicionou-se 25 μ L do MTT (5 mg/mL) em cada poço. As placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ e, para finalizar, foram adicionados 100 μ L de dodecilsulfato de sódio (SDS) 20 % em todos os poços para posterior leitura em espectrofotômetro de placas.

3.7.4 Determinação da taxa de infecção dos macrófagos murinos linhagem J774 tratados com QMA, AB e QMA-AB

Após a aderência nas garrafas, como descrito anteriormente, os macrófagos J774 foram descolados com a o auxílio de um *scrap* e transferidos para um tubo falcon e centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm por duas vezes, sempre descartando o sobrenadante e completando com meio. Ao *pellet* final adicionou-se meio RPMI 1640 sem antibióticos ajustando o número de células desejado por lamínula/poço.

Em placas de cultura de 24 poços (*Jet-Biofil*) foram distribuídas lamínulas redondas com diâmetro de 13 mm, ambas estéreis; e em cada poço foram adicionados os macrófagos J774, os quais foram contados em câmara de Neubauer e a quantidade foi ajustada em meio RPMI 1640 na ordem de 5×10^5 células por poço. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas para aderência das células às lamínulas. As lamínulas foram lavadas duas vezes com meio de cultura RPMI para a remoção das células não aderidas. Foram adicionadas aos poços contendo os macrófagos aderidos às lamínulas, formas promastigotas de *L. amazonensis* na ordem de 5×10^6 por poço, na razão de 10:1, exceto o controle negativo que recebeu apenas 1 mL de meio RPMI 1640.

As placas foram mantidas em estufa a 32°C e atmosfera com 5% CO₂ por 24 horas para internalização da promastigotas. Após esse período, com a internalização das promastigotas e transformação em amastigotas, o sobrenadante foi removido e as lamínulas lavadas com meio de cultura para remoção das promastigotas não internalizadas. Em seguida, foram adicionadas concentrações decrescentes das formulações QMA, AB e QMA-AB previamente diluídas de 100 µg/mL a 0,00075 µg/mL exceto nos controles da infecção células/parasito e controle das células. As

placas foram incubadas por mais 24 horas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2, fixadas com metanol e coradas com corante Panótico Rápido (*Instant Prov-New Prov*). Após a coloração, as lamínulas foram transferidas para lâminas, fixadas com *Ethelan* e examinadas em microscopia de luz (Nikon 100x).

O número de macrófagos infectados e a média do número de parasitos por macrófago foi estimado em 100 células. Os resultados foram expressos como um índice de infecção, que é a porcentagem de macrófagos infectados multiplicada pelo número médio de amastigotas por macrófago (Socorro *et al.*, 2003). O experimento foi realizado em triplicata.

3.8 Estudo *In Vivo*

3.8.1 Testes de toxicidade em camundongos BALB/c sadios

A toxicidade foi avaliada em grupos de camundongos sadios, cinco animais por grupo, tratados com doses crescentes das formulações AB e QMA-AB a partir da dose recomendada de 2 mg/kg/dia. Os animais foram monitorados diariamente por cinco dias e quando vieram a óbito, rins e fígados foram removidos para análise das possíveis alterações histopatológicas.

3.8.2 Análise histopatológica dos rins e fígados dos camundongos BALB/c sadios

Os rins e fígados foram removidos e inseridos em formol a 10%, emblocados em parafina e os cortes fixados em lâmina e corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histopatológica por microscopia óptica.

3.8.3 Infecção dos camundongos BALB/c

Após a purificação e contagem das formas amastigotas, foram inoculadas 1×10^6 formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269 no coxim plantar dos camundongos BALB/c seguindo os Princípios Éticos em Experimentação Animal, postulando-se que todos os procedimentos com animais que possam causar dor e angústia, precisam se desenvolver com sedação, analgesia ou anestesia adequados (COBEA, 2015). Os camundongos com peso de 20 gramas em média foram anestesiados via intramuscular com Cetamina (Ketamin 50 mg/mL) para a indução do estado de sedação, imobilização e analgesia associada com Xilazina (Rompun 20 mg/mL), potente hipnótico, não narcótico com propriedade de relaxamento muscular.

3.8.4 Delineamento do tratamento

O tratamento teve início após 45 dias de infecção com o aparecimento das lesões. As doses utilizadas foram baseadas nos resultados dos testes de toxicidade e de acordo com o protocolo estabelecido, três vezes por semana durante um mês. Os camundongos foram divididos em cinco grupos:

- Grupo I: 23 animais infectados tratados com QMA-AB com dose de 17,5 mg/kg/dia.

- Grupo II: 21 animais infectados tratados com AB com dose 2,5 mg/kg/dia.
- Grupo III: 14 animais infectados tratados com QMA com volume correspondente a 17,5 mg /kg/dia.
- Grupo IV: nove animais infectados não tratados, controle positivo.
- Grupo V: cinco animais sem infecção, controle negativo.

3.8.5 Aferição do diâmetro das patas e peso dos camundongos BALB/c

Os animais foram pesados (g) e o diâmetro das patas (mm) lesionadas foi aferido semanalmente com paquímetro digital (*Tool*).

3.8.6 Pós-tratamento: eutanásia e coleta das amostras biológicas dos camundongos BALB/c para as análises bioquímicas, hematológicas e histopatológicas

Ao término do tratamento, os animais foram eutanasiados por inalação de dióxido de carbono CO₂. Foram coletadas amostras sanguíneas por punção cardíaca as quais foram inseridas em tubo seco e microtubos para recém-nascido contendo ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA) (*Becton Dickinson-BD*) para a realização exames bioquímicos (ureia e creatinina) e hematológicos e encaminhadas ao Laboratório de Análises Especiais LAE-LIM-03 (Laboratório de Investigação Médica-03). As análises foram realizadas no equipamento *COBAS 111(ROCHE)* e equipamento *POCH 100iv Diff Sysmex (ROCHE)*, respectivamente. Os rins e os fígados desses animais também foram removidos, inseridos em cassetes e acondicionados em frascos contendo solução de formol a 10% para análise dos cortes histopatológicos corados com H&E.

3.9 Testes Moleculares

Após a eutanásia, as patas lesionadas dos camundongos tratados foram decepadas e um fragmento de 25 mg de tecido foi acondicionado em freezer a -20°C para extração do DNA genômico e posterior quantificação absoluta da carga parasitária por método molecular qPCR *Real Time*.

3.9.1 Extração do DNA

Os DNAs das amostras de tecido das lesões das patas dos camundongos infectados e tratados, assim como os DNAs do tecido infectado experimentalmente para a confecção da curva padrão da qPCR foram extraídos com kit comercial *QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN)* segundo orientação do fabricante.

Foram adicionados 180 µL do *buffer* ATL no *eppendorf* contendo fragmento da biópsia macerada. A mistura foi homogeneizada em vórtex e adicionou-se 20 µL de solução de proteinase K. A mistura foi homogeneizada novamente em vórtex por 15 segundos, centrifugada rapidamente e incubada por 24 horas em banho seco (56°C) e, periodicamente, homogeneizada em vórtex até a completa lise do fragmento de tecido. 200 µL do *buffer* AL foi adicionado ao tubo que foi submetido à incubação de 70°C por 10 min. Após esse período, foram adicionados 200 µL de etanol (96% a 100%) e o tubo foi homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Essa mistura foi pipetada na coluna contendo um tubo coletor e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, o tubo coletor foi removido e 500 µL do *buffer* AW1 foi pipetado na coluna e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, o tubo coletor foi removido e 500 µL do *buffer* AW2 foi pipetado na coluna que foi centrifugada a 14000 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação, a

coluna foi transferida para um microtubo *eppendorf* de 1,5 mL e no centro da coluna, foram adicionados 100 µL de *buffer* AE. O microtubo ficou incubado por minuto à temperatura ambiente e centrifugado a 8000 rpm por 1min. O DNA extraído foi armazenado em freezer -20°C até o momento do uso.

3.9.2 Quantificação e qualidade dos DNAs

Os DNAs extraídos foram quantificados no fluorômetro *Qubit*[®] 2.0 (Invitrogen) e a qualidade detectada no espectrofotômetro *NanoDrop*[™] 2000/2000c, sendo considerados DNAs de boa qualidade os que apresentaram leitura (260/280 nm) com valores de 1,8 a 2,0. Quando necessário, os DNAs foram submetidos à nova diluição em tampão Tris-etilenodiamina tetra-acético (TE) e armazenados -20°C.

3.9.3 Sensibilidade analítica e eficiência da qPCR *Real Time Sybr Green*[®]

No presente estudo, foi empregado o método de quantificação absoluta por qPCR *Real Time* e procurou-se seguir as diretrizes do *MIQE Guideline (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)*.

Inicialmente, para obtenção da sensibilidade analítica que é expressa como limite de detecção (*LOD-limit of detection*), uma curva padrão foi gerada utilizando-se 25 mg de tecido da pata do camundongo BALB/c sadio ao qual foram adicionadas 10^7 formas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). O DNA da mistura, após a extração, foi eluído em 100 µL de tampão de eluição e submetido à diluição seriada na razão de 1:10 com 7 pontos, 10^5 a 10^{-1} parasitos. Essa curva foi utilizada tanto para verificar a reprodutibilidade intra e interensaios, os quais foram realizados em

momentos distintos, como para realizar a quantificação absoluta da carga parasitária das amostras de tecidos das patas dos camundongos BALB/C infectados e tratados com QMA, AB e QMA-AB.

A reação foi realizada com o reagente comercial fluorescente (MASTER MIX *Sybr Green*® (*ThermoFisher Scientific*) em plataforma *Applied Biosystems*® 7500 *Fast Real-Time PCR System*, utilizando três diferentes concentrações 300, 400 e 500 nM do primer específico desenhado para amplificar uma região inferior a 150, o kDNA 1 *L. amazonensis*:

Forward: 5'-GGTCCCGGCCCAAACCTTTTC-3'

Reverse: 5'-CCGGGGTTTCGCACTCATTT-3'

As reações foram realizadas com água ultrapura e 2,0 µL do DNA de cada diluição da curva de sete pontos, obtendo uma reação com volume final de 10 µL e conduzidas seguindo os parâmetros de termociclagem numa retenção a 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos, temperatura de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. A curva de *melting* foi gerada automaticamente pelo equipamento (Weirather *et al.*, 2011).

3.9.4 Especificidade do *primer*

Embora o *primer* seja específico para *L. amazonensis*, outros DNAs extraídos de culturas de *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiiff* e *L. shawii* (cepas referência fornecidas pelo CLIOC e criopreservadas em nitrogênio líquido no Instituto de Medicina Tropical São Paulo) foram testados. Incluímos também os DNAs de outros patógenos: *T. cruzi*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*.

3.9.5 Quantificação absoluta qPCR *Real-Time Sybr Green*[®] das amostras de tecido dos camundongos infectados e tratados com QMA, AB e QMA-AB

Uma vez estabelecida a concentração ideal do *primer* e a curva padrão, os DNAs das amostras de tecido dos camundongos infectados e tratados foram quantificados seguindo o protocolo supracitado utilizando o método da comparação e os resultados foram expressos em 25 mg/tecido. A presença de inibidores nas amostras foi testada com *primer* constitutivo.

3.10 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados usando análise de variância (ANOVA) complementada pelo pós-teste de Bonferroni, ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O IC₅₀ foi calculado por valores de melhor ajuste de regressão não linear (programa *Graphpad Prism* versão 0.6). As variáveis categóricas foram relatadas em tabelas de contingência e analisadas entre os grupos com teste exato de Fisher. Os valores de média dos parasitos por 25 mg de tecido e por μ g de tecido segundo grupos foram descritas com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, percentil 25 e percentil 75) e comparados os valores entre os grupos com uso de testes Kruskal-Wallis. As análises foram seguidas de comparações múltiplas de Dunn (para identificar entre quais grupos os valores diferiram). As análises foram realizadas com uso do software *IBM-SPSS for Windows* versão 20.0 e tabulados com uso do software *Microsoft-Excel* 2003 e os testes foram considerados estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo *In Vitro*

A Tabela 1 mostra que os grupos foram estatisticamente diferentes quanto às densidades óticas ($p < 0,001$). No grupo tratado com QMA-AB a média das densidades óticas foi menor em relação grupo AB e QMA evidenciando maior potencial leishmanicida. Quanto maior a densidade ótica maior a viabilidade celular. Já para os macrófagos, a média das densidades óticas de QMA-AB foi maior que AB mas inferior à QMA.

Tabela 1- Descrição das densidades óticas do teste MTT com formas promastigotas e macrófagos J774 segundo os grupos

Variável	Grupo			p
	QMA	AB	QMA-AB	
DO MTT promastigotas				<0,001
Média $\pm$ DP	0,5 $\pm$ 0,24	0,27 $\pm$ 0,23	0,18 $\pm$ 0,17	
Mediana (P25; P75)	0,59 (0,31; 0,66)	0,13 (0,09; 0,58)	0,1 (0,07; 0,19)	
DO MTT macrófagos				<0,001
Média $\pm$ DP	1,99 $\pm$ 0,76	1,38 $\pm$ 1,05	1,78 $\pm$ 1,03	
Mediana (P25; P75)	2,15 (1,92; 2,65)	1,25 (0,34; 2,42)	2 (0,88; 2,79)	

Análise de covariância ajustada pelo logaritmo na base 10 da concentração

4.1.2 Determinação da concentração inibitória IC₅₀ das formulações QMA, AB, e QMA-AB em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pelo método colorimétrico MTT

As formulações QMA-AB e AB apresentaram concentração inibitória para 50% (IC₅₀) das formas promastigotas nas concentrações 0,012 µg/mL e 0,023 µg/mL respectivamente. QMA isoladamente apresentou baixa toxicidade para promastigotas em relação à QMA-AB e AB como demonstrado no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Teste colorimétrico MTT para avaliação da viabilidade celular das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com as formulações AB, QMA e QMA-AB. QMA-AB e AB*vs QMA ($p<0,001$), QMA-AB[&] vs QMA ($p<0,01$) AB[#] vs QMA ($p<0,05$) e QMA-AB^s vs AB ($p<0,05$). A figura mostra a média ± DP de três experimentos independentes. A linha vermelha representa 50% de viabilidade celular

4.1.3 Alterações estruturais das formas promastigotas observadas por MET

Foram observadas alterações estruturais nas formas promastigotas tratadas com as formulações QMA (B), AB (C), QMA-AB (D) frente ao controle positivo (A). As promastigotas tratadas com QMA (B) e AB (C) apresentaram alterações citoplasmáticas e nucleares. QMA (B) apresentou condensação mitocondrial e núcleo eletrodenso, além da alteração na forma. As formas tratadas com formulação QMA-AB (D) apresentaram alterações regressivas em relação ao tamanho, estrutura nuclear, degeneração citoplasmática e grande quantidade de vacúolos. (Figura 7)

Figura 7 - Alterações estruturais por MET-Microscopia eletrônica de transmissão das formas promastigotas de *L. amazonensis* incubadas por 24 horas após tratamento com as concentrações das formulações que inibiram o crescimento de 50% das leishmanias (IC_{50}): (A) promastigota controle não apresenta alterações estruturais (BF) bolsa flagelar, (N) Núcleo, (F) flagelo e (K) cinetoplasto; (B) promastigotas tratadas com QMA, há espessamento mitocondrial (K) e o núcleo (N) apresenta-se eletrodenso, (C) promastigotas tratadas com AB, há alteração na forma com presença de pequenas vesículas na membrana (seta preta) e no conteúdo citoplasmático; (D) promastigotas tratadas com QMA-AB, há alteração regressiva das formas, estrutura nuclear e degeneração citoplasmática, mas não há alteração do cinetoplasto (K).

4.1.4 Determinação da concentração citotóxica CC_{50} das formulações QMA-AB, AB e QMA em macrófagos murinos linhagem J774 pelo método colorimétrico MTT

As formulações AB e QMA-AB apresentaram toxicidade para 50% (CC_{50}) dos macrófagos J774 nas concentrações 2,324 $\mu\text{g/mL}$ e 8,106 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. AB foi mais tóxica para os macrófagos com baixa concentração em relação QMA-AB. QMA apresentou baixa toxicidade para os macrófagos (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Teste colorimétrico com MTT para avaliação da viabilidade dos macrófagos J774 tratados com as formulações AB, QMA e QMA-AB. QMA-AB e AB* vs QMA ($p < 0,001$), QMA-AB^s vs QMA ($p < 0,05$) QMA-AB[#] vs QMA ($p < 0,05$). A figura mostra a média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A linha vermelha representa 50% de viabilidade celular

4.1.5 Determinação da taxa de infecção dos macrófagos J774 tratados com QMA, AB e QMA-AB

Nas análises da taxa de infecção representadas no Gráfico 3, a porcentagem de macrófagos infectados foi estatisticamente significativa para a concentração de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$) quando tratados com QMA-AB em relação QMA e AB. Quando tratados com as concentrações de 3,125 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ a redução foi significativa apenas para QMA-AB em relação ao controle QMA ($p < 0,05$).

A taxa de infecção dos macrófagos tratados com AB e QMA nessas concentrações não diferiu.

Gráfico 3 - Atividade leishmanicida das formulações QMA, AB e QMA-AB em macrófagos J774 infectados com *Leishmania amazonensis* com 3 concentrações: 1,56, 3,125 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP (n = 3) QMA-AB* vs QMA $p < 0,01$; QMA-AB[#] vs AB $p < 0,01$ QMA-AB^{\$} vs QMA $p < 0,05$

Em relação ao número de amastigotas por macrófago representado no Gráfico 4, a redução foi significativa para QMA-AB em relação a QMA nas concentrações 1,56 $\mu\text{g/mL}$ e 3,125 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). Já na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, houve redução significativa das formas amastigotas para QMA-AB e AB em relação a QMA, com $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente.

Gráfico 4 - Número de formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* por macrófago (J774) tratados com 3 concentrações: 1,56; 3,125 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP (n=3). QMA-AB* vs QMA $p < 0,05$; QMA-AB [#] vs QMA $p < 0,01$, AB^{\$} vs QMA $p < 0,05$

Os resultados das taxas de infecção estão representados na Figura 8 com a presença de macrófagos J774 infectados e tratados com 1,56 $\mu\text{g/mL}$ das formulações QMA, AB e QMA-AB frente aos controles negativo (A), macrófagos sem infecção, e positivo (B), macrófagos infectados sem tratamento. Pode-se observar nas imagens que os macrófagos tratados com QMA (C) e QMA-AB (E) não há redução no número das células, diferentemente quando tratados com AB (D). A redução do número de amastigotas foi estatisticamente significante ($p < 0,01$) para o grupo QMA-AB em relação a $AB < QMA < \text{controle positivo}$.

Figura 8 - Microscopia óptica da atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis*: (A) macrófagos J774 sem infecção (controle negativo), (B) macrófagos J774 infectados sem tratamento, (C) (D) e (E) macrófagos J774 infectados tratados com concentração de 1,56 µg/mL das formulações QMA, AB e QMA-AB (as setas indicam as formas amastigotas intracelulares e a barra 5 µm, 100x)

A partir dos resultados descritos anteriormente foi possível determinar o índice de seletividade (IS) que é a razão entre o CC_{50} / IC_{50} , o qual mede a ação da formulação sobre o parasito sem causar danos ao macrófago. Na Tabela 2, a formulação QMA-AB apresentou IS aproximadamente seis vezes o IS de AB indicando maior atividade leishmanicida e menor toxicidade aos macrófagos J774.

Tabela 2 - Valores do CC_{50} para macrófagos J774 e IC_{50} para formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e seus respectivos índices de seletividade

Formulação	CC_{50} $\mu\text{g/mL}$	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	IS
AB	2,324	0,023	101,4
QMA-AB	8,106	0,012	675,5

CC_{50} : concentração citotóxica para 50% dos macrófagos J774; IC_{50} : concentração que inibe 50% das formas promastigotas de leishmania; IS: índice de seletividade.

4.2 Estudo *In Vivo*

4.2.1 Testes de toxicidade em camundongos BALB/C sadios (análises histopatológicas)

Verificou-se nos exames histopatológicos a presença de nódulos inflamatórios no fígado dos camundongos saudáveis (3/5) quando receberam dose diária de 2,5 mg/kg/dia de AB, porém nenhuma alteração renal foi detectada. Já os grupos dos animais que receberam 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia todos (5/5) foram a óbito no quinto e primeiro dia, apresentando alterações hepáticas como esteatose moderada difusa dos hepatócitos (1/5) e (3/5), respectivamente, e alterações renais como congestão intensa dos vasos (4/5) para ambos os grupos. Os grupos que receberam QMA-AB com doses de 2, 4, 8 mg/kg/dia não apresentaram alterações hepáticas ou renais. Apenas o grupo que recebeu 16 mg/kg/dia foi detectada

esteatose microgoticular em região médio zonal (1/5). Esses animais não vieram a óbito durante o período de tratamento. Os animais dos grupos que receberam 20 e 30 mg/kg/dia de QMA-AB apresentaram esteatose intensa difusa (2/5) e esteatose microgoticular dos hepatócitos (5/5) com significativo processo degenerativo e vieram a óbito em 48 horas (4/5) e (5/5), respectivamente.

Em relação às alterações renais os animais dos grupos que receberam 20 mg/kg/dia e 30 mg/kg/dia de QMA-AB foi detectada esteatose difusa e intensa dos túbulos próximos e distais (2/5) para ambos os grupos. Os fígados dos animais do grupo que recebeu 35 mg/kg/dia não foram analisados devido a inviabilidade das amostras e vieram a óbito em 36 horas (5/5). Os animais deste grupo (2/5) apresentaram esteatose severa em todos os túbulos proximais e distais. Não foram colhidas amostras de sangue desses animais.

Os resultados dos testes de toxicidade: óbito, alterações renais e hepáticas após administração das doses crescentes das formulações AB e QMA-AB estão expressos na Tabela 3. As imagens da Figura 9 mostram as alterações renais e hepáticas sofridas pelos camundongos saudáveis quando doses elevadas de ambas as formulações foram administradas nos testes de toxicidade.

Tabela 3 - Testes de Toxicidade em camundongos BALB/c sadios

AB 5 mg/mL	Dose µg	Óbito/dia	Alterações hepáticas	Alterações Renais
2,5	50	-	Nódulo inflamatório n= 3/5	Sem alteração (n=5/5)
5,0	100	*5º (n=5/5)	Esteatose moderada difusa dos hepatócitos (n= 1/5)	Congestão intensa dos vasos (n=4/5)
10,0	200	*1º (n=5/5)	Esteatose moderada difusa dos hepatócitos (n=3/5)	Congestão intensa dos vasos (n=4/5)
QMA- AB 1mg/mL	Dose µg	Óbito/dia	Alterações hepáticas	Alterações Renais
2	20	-	Sem alteração	Sem alteração
4	40	-	Sem alteração	Sem alteração
8	80	-	Sem alteração	Sem alteração
16	160	-	Esteatose microgoticular em região médio zonal (n=1/5)	Sem alteração
20	400	2º (n=4/5)	Esteatose severa difusa dos hepatócitos/processo degenerativo importante (n=2/5)	Sem alteração
30	600	*2º (n=5/5)	Esteatose microgoticular difusa/ processo degenerativo difuso necrose (n=5/5)	Esteatose difusa dos epitélios dos túbulos proximais e distais(n=2/5)
35	700	*1º (n=5/5)	NA (Não analisado)	Esteatose intensa em todos os túbulos proximais e distais (n=2/5)

* Todos animais vieram a óbito

Figura 9 - Fotomicrografia dos exames histopatológicos dos rins e fígados dos camundongos saudáveis corados com hematoxilina e eosina. (A) fígado com esteatose microgótica QMA-AB 16 mg/kg/dia (400X); (B) fígado com esteatose severa difusa, QMA-AB 20 mg/kg/dia (400 X); (C) fígado com nódulo inflamatório, AB 2,5 mg/kg/dia (400x), (D) fígado com esteatose hepática moderada difusa, AB 5,0 mg/kg/dia (400x); (E) rim mostrando congestão intensa dos vasos, AB 5,0 e 10 mg/kg/dia (400x), (F), rim com esteatose nos túbulos proximais e distais QMA-AB 30 e 35 mg/kg/dia (400X), (G) rim normal e (H) fígado normal

4.2.2 Tratamento

4.2.2.1 Aferição do peso dos camundongos BALB/c infectados tratados

O Gráfico 5 sugere aumento nos pesos dos animais em todos os grupos com o passar dos dias, sendo que não parece haver diferença no comportamento dos grupos ao longo dos momentos de avaliação. Exceto para o grupo tratado com AB que apresentou redução do peso após a primeira semana de tratamento.

Gráfico 5 - Evolução temporal dos perfis médios dos pesos dos animais e respectivos erros padrões segundo grupos

Na Tabela 4, tem-se que o peso médio dos animais do grupo QMA-AB foi estatisticamente menor que os demais grupos ($p < 0,05$), exceção apenas com o grupo CN ($p > 0,999$), sendo o que o peso médio do CN também foi estatisticamente menor que o grupo QMA ($p = 0,010$). Houve aumento médio estatisticamente significativo no peso dos animais praticamente entre cada momento de avaliação ($p < 0,05$), exceto entre momentos imediatamente consecutivos ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Resultado das comparações dos pesos dos animais entre grupos e momentos de avaliação

Comparações	Diferença média	Erro padrão	P	IC (95%)	
				Inferior	Superior
QMA-AB vs. AB	-2,25	0,50	<0,001	-3,67	-0,84
QMA-AB vs. QMA	-3,16	0,56	<0,001	-4,73	-1,59
QMA-AB vs. CN	-0,66	0,71	>0,999	-2,65	1,34
QMA-AB vs. CP	-2,52	0,65	0,001	-4,34	-0,70
AB vs. QMA	-0,90	0,57	>0,999	-2,52	0,71
AB vs. CN	1,60	0,72	0,273	-0,43	3,63
AB vs. CP	-0,26	0,66	>0,999	-2,12	1,59
QMA vs. CN	2,50	0,76	0,010	0,36	4,64
QMA vs. CP	0,64	0,70	>0,999	-1,33	2,62
Antes do trat. vs. 7 dias de trat.	-0,26	0,13	0,454	-0,63	0,11
Antes do trat. vs. 14 dias de trat.	-0,58	0,18	0,013	-1,08	-0,07
Antes do trat. vs. 21 dias de trat.	-0,83	0,21	0,001	-1,42	-0,24
Antes do trat. vs. 30 dias de trat.	-1,27	0,24	<0,001	-1,93	-0,61
7 dias de trat. vs. 14 dias de trat.	-0,31	0,13	0,171	-0,68	0,06
7 dias de trat. vs. 21 dias de trat.	-0,57	0,18	0,015	-1,07	-0,07
7 dias de trat. vs. 30 dias de trat.	-1,01	0,21	<0,001	-1,60	-0,42
14 dias de trat. vs. 21 dias de trat.	-0,26	0,13	0,518	-0,62	0,11
14 dias de trat. vs. 30 dias de trat.	-0,70	0,18	0,001	-1,20	-0,19
21 dias de trat. vs. 30 dias de trat.	-0,44	0,13	0,008	-0,81	-0,07

Comparações múltiplas de Bonferroni.

4.2.2.2 Aferição do diâmetro das patas dos camundongos BALB/c infectados tratados

O Gráfico 6 sugere, principalmente, que os diâmetros das patas no grupo QMA-AB diminuíram com o passar do tempo, no grupo CN os diâmetros apresentaram-se estáveis ao longo dos tempos e nos demais grupos aumentaram com o passar do tempo.

Gráfico 6 - Evolução temporal dos perfis médios dos diâmetros das patas dos animais e respectivos erros padrões segundo os grupos

A Tabela 5 mostra que antes do tratamento o grupo CN apresentou diâmetro médio das patas estatisticamente menor que os grupos QMA-AB e AB ($p = 0,043$ e $p = 0,004$ respectivamente); aos 7 dias de tratamento a diferença entre os grupos CN e AB permaneceu ($p = 0,003$); aos 14 dias de tratamento o grupo CN apresentou menor diâmetro médio das patas estatisticamente significativo que os grupos AB e CP; aos 21 dias de tratamento, além dos grupos anteriores, o grupo CN apresentou menor valor que o grupo QMA e aos 30 dias de tratamento. O grupo QMA-AB apresentou em média menor diâmetro das patas que os grupos AB, QMA e CP ($p < 0,05$) e o grupo CN apresentou em média menor valor que os grupos AB, QMA e CP ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Resultado das comparações dos diâmetros das patas dos animais entre os grupos em cada momento de avaliação

Momento	Comparações	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Antes do tratamento	QMA-AB vs. AB	-0,50	0,54	>0,999	-2,53	1,54
	QMA-AB vs. QMA	0,60	0,60	>0,999	-1,66	2,86
	QMA-AB vs. CN	2,91	0,76	0,043	0,03	5,79
	QMA-AB vs. CP	0,21	0,70	>0,999	-2,41	2,84
	AB vs. QMA	1,10	0,62	>0,999	-1,22	3,42
	AB vs. CN	3,40	0,78	0,004	0,48	6,33
	AB vs. CP	0,71	0,71	>0,999	-1,96	3,39
	QMA vs. CN	2,30	0,82	>0,999	-0,78	5,39
	QMA vs. CP	-0,39	0,76	>0,999	-3,24	2,46
	CN vs. CP	-2,69	0,89	0,762	-6,05	0,67
7 dias de tratamento	QMA-AB vs. AB	-0,79	0,54	>0,999	-2,83	1,25
	QMA-AB vs. QMA	0,02	0,60	>0,999	-2,24	2,28
	QMA-AB vs. CN	2,64	0,76	0,169	-0,24	5,51
	QMA-AB vs. CP	-0,49	0,70	>0,999	-3,11	2,13
	AB vs. QMA	0,82	0,62	>0,999	-1,51	3,14
	AB vs. CN	3,43	0,78	0,003	0,50	6,36
	AB vs. CP	0,30	0,71	>0,999	-2,37	2,98
	QMA vs. CN	2,61	0,82	0,431	-0,47	5,70
	QMA vs. CP	-0,51	0,76	>0,999	-3,36	2,33
	CN vs. CP	-3,13	0,89	0,138	-6,49	0,23
14 dias de tratamento	QMA-AB vs. AB	-1,20	0,54	>0,999	-3,23	0,84
	QMA-AB vs. QMA	-0,83	0,60	>0,999	-3,09	1,43
	QMA-AB vs. CN	2,22	0,76	>0,999	-0,65	5,10
	QMA-AB vs. CP	-1,56	0,70	>0,999	-4,18	1,06
	AB vs. QMA	0,36	0,62	>0,999	-1,96	2,69
	AB vs. CN	3,42	0,78	0,003	0,49	6,35
	AB vs. CP	-0,36	0,71	>0,999	-3,04	2,31
	QMA vs. CN	3,06	0,82	0,057	-0,03	6,14
	QMA vs. CP	-0,72	0,76	>0,999	-3,57	2,12
	CN vs. CP	-3,78	0,89	0,007	-7,14	-0,42
21 dias de tratamento	QMA-AB vs. AB	-1,65	0,54	0,680	-3,69	0,39
	QMA-AB vs. QMA	-1,48	0,60	>0,999	-3,74	0,78
	QMA-AB vs. CN	2,04	0,76	>0,999	-0,84	4,92
	QMA-AB vs. CP	-2,17	0,70	0,548	-4,79	0,45
	AB vs. QMA	0,17	0,62	>0,999	-2,15	2,49
	AB vs. CN	3,69	0,78	0,001	0,76	6,62
	AB vs. CP	-0,52	0,71	>0,999	-3,19	2,16
	QMA vs. CN	3,52	0,82	0,005	0,44	6,61
	QMA vs. CP	-0,69	0,76	>0,999	-3,54	2,16
	CN vs. CP	-4,21	0,89	0,001	-7,57	-0,85

Continua

Momento	Comparações	Diferença média	Erro padrão	P	Conclusão	
					IC (95%)	
					Inferior	Superior
30 dias de tratamento	QMA-AB vs. AB	-2,50	0,54	0,001	-4,53	-0,46
	QMA-AB vs. QMA	-2,61	0,60	0,004	-4,87	-0,35
	QMA-AB vs. CN	1,55	0,76	>0,999	-1,33	4,43
	QMA-AB vs. CP	-2,95	0,70	0,007	-5,57	-0,33
	AB vs. QMA	-0,12	0,62	>0,999	-2,44	2,20
	AB vs. CN	4,05	0,78	<0,001	1,12	6,97
	AB vs. CP	-0,45	0,71	>0,999	-3,13	2,22
	QMA vs. CN	4,16	0,82	<0,001	1,08	7,25
	QMA vs. CP	-0,33	0,76	>0,999	-3,18	2,51
	CN vs. CP	-4,50	0,89	<0,001	-7,86	-1,14

Comparações múltiplas de Bonferroni.

A Figura 10 mostra as patas lesionadas dos camundongos BALB/c infectados antes do tratamento e depois da 4ª semana de tratamento frente ao controle negativo e positivo.

Figura 10 - As imagens 1A, 2A e 3A representam os grupos QMA-AB, AB e QMA antes do tratamento, respectivamente. As imagens 1B, 2B e 3B representam os mesmos grupos depois do tratamento e N e P representam os controles, negativo e positivo

4.2.2.3 Exames bioquímicos

Em relação aos exames bioquímicos, os grupos apresentaram-se homogêneos em relação à ureia e creatinina (Tabela 6). Os dados foram expressos como média±DP.

Tabela 6 - Resultado das dosagens de ureia e creatinina sérica dos camundongos BALB/c segundo os grupos

mg/dL	QMA	AB	QMA-AB
Ureia	55,1±12,4	55±11,9	60,7±0,2
Creatinina	0,3±0,04	0,2±0,09	0,2±0,05

4.2.2.4 Hemograma dos camundongos BALB/c infectados tratados com as formulações

Os grupos foram homogêneos em relação às variáveis do eritrograma e leucograma e contagem de plaquetas (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados do eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas estão expressos como média ± desvio padrão

Hemograma	NC	PC	QMA	AB	QMA-AB
Eritrograma					
Eritrócitos (10 ⁹ /mL)	9,8±0,9	9,1±1,2	9,5±479	9,7±1603	8,9±1560
Hemoglobina (g/dL)	15,5±1,2	15,1±0,8	14,9±0,7	14,8±1,8	13,8 ±2,3
Hematócrito (%)	47,7±3,3	47,2±1,8	46,9±2,6	46,5 ±4,8	43,7 ±7,9
Leucograma					
Leucócitos (10 ⁶ /mL)	5900±3218	4125±2263	4686±1903	5533±1927	5176±2135
Neutrófilos (%)	29,0±7	38±23	34±20	39±18	39±16
Linfócitos (%)	64,4±8	54,8±19,5	56,7±19	54±15	56±14
Monócitos (%)	6,2±8	7±9,6	10±11	7,2±10,2	4,3±5,2
Plaquetas (mil/mm³)	1031±362	1215±160	1006±479	1064±452	1051±519

4.2.2.5 Exames histopatológicos dos rins e fígados dos camundongos BALB/c infectados e tratados com QMA, AB e QMA-AB

Após o tratamento também foram realizadas análises histopatológicas dos animais infectados tratados. As alterações renais não foram estatisticamente significantes, porém foi observada a presença de nódulos inflamatórios, esteatose, pielonefrite e degeneração nos grupos tratados com AB e QMA-AB. O grupo tratado com QMA não apresentou alterações renais. Acerca das alterações hepáticas, o grupo AB apresentou 100% de alterações, 75% de nódulos inflamatórios ($p<0,001$), 19% de esteatose e 6% de inflamação das células de Kupffer. O grupo tratado com QMA-AB apresentou 20% de nódulos, 10% de esteatose e 5% de área isquêmica e 65% foram normais. Os animais do grupo QMA apresentaram 90% de normalidade (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados das análises histopatológicas dos rins e fígados dos animais infectados tratados com QMA, AB e QMA-AB

	QMA	AB	QMA-AB	P<0,05
RIM				
Normal	10/10 (100%)	15/16 (94%)	16/20 (85%)	0,354
Nódulo inflamatório	0/10 (0%)	1/16 (6%)	0/20 (0%)	0,384
Esteatose	0/10 (0%)	0/16 (0%)	1/20 (5%)	0,515
Pielonefrite	0/10 (0%)	0/16 (0%)	1/20 (5%)	0,515
Degeneração	0/10 (0%)	0/16 (0%)	1/20 (5%)	0,515
Fígado				
Normal	9/10 (90%)	0/16 (0%)	13/20(65%)	<0,001
Nódulo inflamatório	1/10 (10%)	12/16 (75%)	4/20 (20%)	<0,001
Esteatose	0/10 (0%)	3/16 (19%)	2/20 (10%)	0,341
Área isquêmica	0/10 (0%)	0/16 (0%)	1/20 (5%)	1,000
Inflamação célula de Kupffer	0/10 (0%)	1/16 (6%)	0/20 (0%)	0,565

*ANOVA $p<0,05$.

4.2.2.6 Sensibilidade analítica e linearidade da reação de qPCR *Real Time Sybr Green*[®]

Os pontos gerados após diluição seriada, apresentaram concentrações de 50 ng a 5 fg do DNA do parasito de *L. amazonensis* correspondente a 100.000 e 0,1 do parasito por reação.

Na Tabela 9 estão representados os resultados da média dos *Cts* da curva padrão intra-ensaios realizados em triplicata e a média, desvio padrão e coeficiente de variação interensaios realizados em momentos diferentes. O limite mínimo de detecção (*LOD limit of detection*) ficou entre 1 e 0,1 parasito/25 mg de tecido com média inter *Cts* entre 33 e 35. As amostras foram consideradas positivas com *Cts* < 36.

Tabela 9 - Valores dos *Ct*s (*cycle threshold*) intra e interensaios e suas respectivas médias, desvios padrão e coeficientes de variação

Parasitas/ 25mg tecido	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	Ct5	Ct6	Ct7	Ct MÉDIA 7	Ct SD	CV	95% IC	
											Inferior	Superior
100000	16,9319	15,9204	16,6461	16,2797	16,5035	16,4429	16,3343	16,4369	0,3149	0,0191	4,2603	16,6703
10000	20,5200	19,3706	19,8947	19,5745	19,9051	19,9018	19,8622	19,8612	0,3562	0,0179	5,1478	20,1252
1000	23,8489	22,9091	23,4618	22,9734	23,2637	23,1201	23,1006	23,2396	0,3253	0,014	6,0235	23,4807
100	26,9854	26,1809	26,8985	26,2886	26,3451	26,3468	26,239	26,4691	0,329	0,0124	6,8605	26,713
10	30,0013	29,7289	30,0954	29,735	30,1749	29,2632	29,972	29,8529	0,3098	0,0103	7,7376	30,0825
1	33,4755	32,866	33,4137	32,9071	33,4515	33,5469	33,5637	33,318	0,2945	0,0088	8,6336	33,5282
0.1	35,9562	36,9555	34,9244	ND	34,9276	ND	ND	35,69	0,9737	0,0272	0,7138	36,6445

A linearidade da curva padrão é refletida pelo coeficiente de correlação R^2 que é a medida de como os pontos se ajustam na curva, sendo que o valor ideal deve ser igual a 1. A curva padrão gerada apresentou coeficiente de linearidade $R^2=0,999$, inclinação ideal com *slope* de -3,374 e eficiência dentro do padrão aceitável com valor de 97,86%. A curva de dissociação (curva de *melting*) apresentou sobreposição das curvas gerando um pico à uma temperatura em torno de 81,5°C (Figura 11).

Figura 11 - (A) Gráfico da curva padrão amplificada da qPCR utilizando o *primer* kDNA1 *L. amazonensis* a partir do DNA extraído da amostra de 25mg de tecido de camundongo sadio batizado com 10^7 formas promastigotas de cultura e eluído em 100 μ l de tampão de eluição e submetido à diluição seriada (sete pontos- 10^5 - 10^{-1}) (B) Curva de *melting*

4.2.2.7 Especificidade do *primer*

O primer apresentou 100 % de especificidade para *L. amazonensis*, não amplificando as outras espécies de *Leishmania*. Não houve também amplificação para os outros microorganismos testados *T. cruzi*, *Histoplasma Capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*.

4.2.2.8 Quantificação absoluta das amostras de tecido dos camundongos tratados qPCR *Real Time*

A quantificação absoluta dos parasitos/mg de tecido por qPCR *Real Time* está representada no Gráfico 7, sendo carga parasitária/mg de tecido foi inferior a 100 e 1000 parasitos para os grupos QMA-AB e AB respectivamente. A redução foi estatisticamente significativa para o grupo QMA-AB e relação ao grupo QMA e AB ($p < 0,001$). A carga parasitária/mg de tecido do grupo QMA foi superior a 1000 parasitos.

Gráfico 7 - Quantificação absoluta de parasitos por miligrama de tecido da pata dos camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* tratados com QMA, AB e QMA-AB por qPCR- *Real Time*

Os resultados estão expressos como média ± DP. QMA-AB* vs QMA $p < 0,001$ QMA-AB# vs AB $p < 0,001$

Os resultados das médias e desvios padrão das quantificações absolutas foram expressos em 25 mg e 1mg de tecido, estão representados na Tabela 10. A redução da carga parasitária foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para o grupo QMA-AB em relação ao grupo QMA e AB.

Tabela 10 - Resultado da quantificação dos parasitos nas amostras de tecido dos camundongos tratados segundo os grupos

Variável	Grupo			p
	QMA (N = 14)	AB (N = 21)	QMA-AB (N = 23)	
Média 25 mg				<0,001
Média $\pm$ DP	115479,8 $\pm$ 200325,9	17691 $\pm$ 18400	1227,3 $\pm$ 2001	
Mediana (P25; P75)	55672 (38970,5; 104491,3)	11144 (8433,5; 14813,5)	177 (120; 1302)	
Média parasitos/mg				<0,001
Média $\pm$ DP	4618,8 $\pm$ 8013,1	932,4 $\pm$ 1231,9	49,1 $\pm$ 80,1	
Mediana (P25; P75)	2226,5 (1558,3; 4179)	445,7 (337,3; 855,1)	7 (4,8; 53)	

Na Tabela 11 estão representadas as comparações das médias das cargas parasitárias entre os grupos, sendo que a média dos parasitos foi inferior e estatisticamente significativa para o grupo QMA-AB em relação aos demais grupos. Quando comparado à AB, o grupo QMA apresentou média de parasitos superior com significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Resultado das comparações das médias dos parasitos nas amostras de tecidos dos camundongos tratados segundo os grupos

Variável	Comparações	Valor Z	p
Média parasitos/25 mg de tecido	QMA-AB vs. AB	-3,25	0,001
	QMA-AB vs. QMA	-4,77	<0,001
	AB vs. QMA	-2,60	0,009
Média parasitos/mg	QMA-AB vs. AB	-3,34	<0,001
	QMA-AB vs. QMA	-4,65	<0,001
	AB vs. QMA	-2,33	0,020

Comparações múltiplas de Dunn.

5 DISCUSSÃO

Das formulações lipídicas comerciais, a formulação lipossomal de AmB, foi melhor tolerada e eficaz contra LV em alta dose única alta (7,5 mg/kg a 10 mg/kg) (Mondal *et al.*, 2014), contra CL em doses múltiplas (3 mg/kg/dia para um total de 21 mg/kg) (Wortmann *et al.*, 2010) e na PKDL (dois ciclos de 4×5 mg/kg) (Basher *et al.*, 2017).

Em estudo realizado por Rocio *et al.* (2014), a anfotericina B lipossomal, na dose total de 30 mg/kg a 35 mg/kg, apresentou eficácia no tratamento de pacientes com LM, sendo uma alternativa no tratamento dos pacientes que apresentam restrição aos tratamentos convencionais.

Os pacientes com lesões renais ou com anemia induzida por desoxicolato de anfotericina B podem completar seu tratamento com formulações lipídicas, geralmente sem agravar tais efeitos adversos. Por conseguinte, o principal benefício destas preparações em termos de toxicidade celular é a sua maior segurança no uso prolongado de anfotericina B (Martinez, 2006). As formulações lipídicas apesar da melhora do índice terapêutico seu uso ainda permanece limitado devido ao alto custo (Ribeiro *et al.*, 2014).

Além dos sistemas de liberação utilizando formulações lipídicas já existentes, outros sistemas de liberação de AB tem sido desenvolvidos como as nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) e ácido dimercaptosuccínico, nanopartículas nanométricas de quitosana, micelas poliméricas utilizando uma formulação à base de

1,2-distearoilglicerol-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000], micelas poliméricas formuladas a partir de uma série de copolímeros poli(etilenoglicol)-poli(láctido) com vários comprimentos de cadeia poliláctida para AmpB e nanopartículas poliméricas de cargas opostas à base de quitosana (NQ), associadas ao sulfato de condroitina (NQC) as quais foram testadas *in vitro* em diferentes linhagens celulares, concentrações e métodos, e *in vivo*, em modelos experimentais e protocolos de tratamento distintos (Darole *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2010; Asthana *et al.*, 2013; de Carvalho *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015).

Estudos pré-clínicos foram realizados empregando-se AB-emulsão com composição lipídica (70% trioleína, 27% fosfatidilcolina e 3% colesterol) e metabolização similar aos quilomícrons da linfa (Souza *et al.*, 1993; Souza e Campa, 1999). Neste contexto, AB-emulsão foi desenvolvida e avaliada por meio de ensaios *in vitro* demonstrando redução da toxicidade em leucócitos PMN (Marzzullo *et al.*, 1997) e em eritrócitos, bem como a manutenção da eficiência de AB contra *Candida albicans* (Souza *et al.*, 1993). Estes resultados foram condizentes com estudos *in vivo* em que ratos e camundongos foram utilizados para avaliação histopatológica e farmacológica, observando-se redução dos efeitos tóxicos de AB (Souza *et al.*, 2000).

No presente estudo, foi utilizado o mesmo sistema de liberação de AB nanoemulsões lipídicas rica em triglicérides, essas nanopartículas são semelhantes aos quilomícrons naturais com potencial biocompatibilidade já relatada nos estudos supracitados e com diâmetro tamanho de 100 nm. O tamanho da nanopartícula pode influenciar no tempo e na velocidade que levam para ultrapassar a barreira endotelial e no resultado do tratamento.

Em estudo que foi utilizado Fungisome[®], o tamanho da partícula foi três vezes maior (~220nm) comparado a Ambisome (Jadhav *et al.*, 2011).

Inicialmente, no presente estudo, nos testes de toxicidade *in vitro* com formas promastigotas observou-se que o IC₅₀ da formulação AB foi aproximadamente duas vezes o valor de QMA-AB. Já para os macrófagos, o CC₅₀ de QMA-AB foi superior à AB que foi mais tóxica para os macrófagos com baixa concentração. O resultado do IS do presente estudo utilizando quilomícrons artificiais foi de 675,5 para QMA-AB e 101,4 para AB, sendo portanto menos tóxica que AB. Caldeira *et al.* (2015) testaram uma nanopartícula de colesterol que quando associada à AB também foi eficaz contra *Leishmania* e menos tóxica para os macrófagos, apresentando IS de 57. O IS para AB isoladamente foi de 16. Nos resultados das análises da microscopia eletrônica, as formas promastigotas tratadas após um período de 24 horas com AB apresentaram menos alterações morfológicas que QMA-AB. No grupo tratado com QMA-AB as formas apresentaram-se regressivas em relação ao tamanho, organização citoplasmática e grande quantidade de vacúolos, mas o cinetoplasto não apresentou alterações.

A sobrevivência e proliferação da *Leishmania* dentro do VP depende de estratégias de evasão, pois os macrófagos possuem um potente arsenal de defesa espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, lisozimas, outras moléculas microbicidas e produção de citocinas TH1 para inibir o parasito. Porém, as estratégias de sobrevivência de *Leishmania* incluem: a glicoproteína gp63, uma metaloprotease que facilita a ligação das promastigotas metacíclicas via receptor do complemento CR3 provocando *burst* oxidativo em macrófagos, inativação dos componentes C3, C5, C9 por fosforilação, inibição da expressão da iNOS de macrófagos hospedeiros e

indução da doença exacerbando a produção de citocinas Th2 e supressão da produção de citocinas tipo Th1 (Singh *et al.*, 2012). Dentre essas estratégias, a implicação de lipídios tem sido pouco explorada (Paloque *et al.*, 2019).

Estudos usando imagens de parasitos imunomarcados mostraram a natureza dinâmica do VP. O aumento no tamanho dos VPs de *L. amazonensis* foi associado com uma diminuição das vesículas ácidas nos macrófagos infectados. Um transportador carregado de fármaco pode ser absorvido por fagocitose e a vesícula ligada à membrana pode se fundir com o VP e ajudar na liberação de parasitos dentro do macrófago ou o fármaco pode se difundir para o VP a partir do citoplasma e entrar nos parasitos depois que o transportador for degradado dentro do VP. O fornecimento bem sucedido de drogas é genericamente baseado na redução da carga parasitária nos macrófagos infectados (Shaw e Carter, 2014).

Os resultados da taxa de infecção do presente estudo indicaram consistente redução da infecção nos macrófagos J774 quando tratados com QMA-AB em relação à AB com concentração não tóxica para os macrófagos, sugerindo que o sistema de entrega do fármaco foi capaz de difundir-se a partir do VP e degradar-se no citoplasma liberando AB contra as amastigotas internalizadas. A taxa de infecção nos macrófagos foi cerca de 18%, 32% e 37% para QMA-AB, AB e QMA respectivamente quando tratados com baixa concentração de 1,56 µg/mL. Porém observou-se uma redução desse percentual em torno de 15%, 25% e 35% e 15%, 20% e 35%, quando tratados com as concentrações de 3,125 µg/mL e 6,25µg/mL respectivamente. Notoriamente, há uma redução da taxa de infecção dos macrófagos quando tratados com AB à medida que a concentração aumenta, porém, considerando-se que o CC₅₀ de AB foi de 2,324 µg/mL, concentrações acima desse

valor podem ser mais tóxicas eliminando também os macrófagos infectados e não apenas as amastigotas internalizadas.

Após os testes *in vitro*, uma vez encontrada a concentração inibitória em formas promastigotas de *L. amazonensis* e a concentração citotóxica em macrófagos J774 foram realizados testes de toxicidade adicionais *in vivo* em camundongos saudáveis com o intuito de definir as dosagens das formulações AB e QMA-AB e o protocolo apropriado para o tratamento da leishmaniose tegumentar em camundongos BALB/c. Um grande desafio é validar e comparar os ensaios *in vitro* e *in vivo* pois existem diferenças de concentrações e doses administradas (Han *et al.*, 2012). Os resultados dos testes *in vitro* não condizem com testes *in vivo* devido a vários fatores principalmente a resposta imune.

Os resultados dos testes de toxicidade *in vivo* aqui relatados, auxiliaram na determinação das concentrações das doses para cada uma das formulações, AB e QMA-AB, a serem administradas no tratamento dos camundongos infectados. Verificou-se que quando foram administradas doses de 2,5 mg/kg/dia e 16,0 mg/kg/dia das formulações AB e QMA-AB, respectivamente, em camundongos saudáveis, não houve óbito ou alterações histológicas significantes. Quando doses acima de 2,5 mg/kg/dia de AB e 20 mg/kg/dia, 30 mg/kg/dia e 35 mg/kg/dia de QMA-AB foram administradas, os animais vieram à óbito.

Como evidenciado foi possível utilizar doses elevadas por via intraperitoneal da formulação QMA-AB, 17,5 mg/kg/dia, em relação à AB, 2,5 mg/kg/dia. O uso da formulação lipídica QMA permitiu um aumento de aproximadamente três vezes a dose terapêutica de anfotericina sobre a dose letal do medicamento isolado (5 mg/kg/dia). Deve-se levar em conta a via de administração, pois quando o fármaco é

administrado por via intravenosa, a completa biodisponibilidade pode elevar a toxicidade, assim como a aplicação do Fungisome[®] no tratamento intravenoso de camundongos BALB/c infectados com *L. major* com doses de 5 mg/kg, 10 mg/kg e 15 mg/kg, os quais apresentaram sinais de toxicidade e óbito no grupo tratado com 15 mg/kg. Quando tratados com a mesma dose de Ambisome[®], nada foi observado (Wijnant *et al.*, 2018).

Souza e Campa (1999) ao realizarem testes de toxicidade com AB e sua associação à nanoemulsão rica em triglicérides para o tratamento de *Candida albicans* em ratos *Wistar* observaram 40% de óbito nos animais tratados com 4 mg/kg/dia com AB convencional, 100% de animais vivos quando tratados nessa mesma concentração para a associação, e 100% de óbito quando tratados com 18 mg/kg/dia.

Os animais do presente estudo tratados com AB não puderam receber concentração superior a 2,5 mg/kg/dia, visto que vieram a óbito no quinto dia quando tratados com 5 mg/kg/dia além das alterações hepáticas e renais encontradas nas análises histopatológicas, como esteatose moderada e congestão intensa dos vasos, respectivamente. Estudos mostram que a administração continuada de AB leva à insuficiência renal devido a necrose tubular aguda (Souza *et al.*, 2000). Já Sifontes *et al.* (2015), elevaram a dose de AB para 5 mg/kg/dia a cada 48 horas, na tentativa de melhorar a eficácia do tratamento em camundongos BALB/c também infectados com *L. amazonensis*. Embora não publicado, em outro estudo dos mesmos autores, essa foi a maior dose não letal administrada por uma única injeção via intraperitoneal em camundongos BALB/c fêmeas. Do mesmo modo, foi a dose máxima tolerada de AB encontrada em experimentos descritos por Murray *et al.*, (1996) e Manandhar *et al.*

(2008), embora nesse último estudo, o protocolo de tratamento da leishmaniose visceral foi de cinco dias consecutivos também por via intraperitoneal em hamster dourado.

Em estudo realizado por Reimão *et al.* (2013), a dose mais alta utilizada de AB para o tratamento da LT em murinos foi de 4 mg/kg/dia devido aos efeitos tóxicos. Acerca da redução da carga parasitária, essa foi reduzida, mas o tratamento não levou à resolução duradoura da doença. Esta eficácia parcial do AmB tem sido reportada (Al-Abdely *et al.*, 1999; Parra *et al.*, 2010) e associada com alta taxa de multiplicação de parasitos no local da infecção (Fuchino *et al.*, 2008).

Santos *et al.* (2018) relataram toxicidade aguda quando a dose de 2 mg/kg da formulação convencional de AB foi administrada, causando a morte de vários animais e, portanto, este estudo foi interrompido. Esses achados estão de acordo com outros relatos, que mostraram que a dose letal mediana da formulação convencional AmB em camundongos foi de 2,3 mg/kg/dia (Paul *et al.*, 1997; Gondal *et al.*, 1989; Olsen *et al.*, 1991; Mohamed *et al.*, 2012). Em contraste, a administração da NE carregado com a mesma dose não resultou em qualquer sinal de toxicidade aguda, perda de peso e morte. Com base nesses relatos e nos ensaios de toxicidade do presente estudo, as doses adequadas de AB e QMA-AB para tratamento ficou estabelecida em 2,5 mg/kg/dia e 17,5 mg/kg/dia, respectivamente, sendo administrada em dias alternados.

No delineamento experimental, por se tratar de dois estudos, a quantidade de animais diferiu entre os grupos, sendo maior para os grupos AB e QMA-AB, porém por questões éticas, optou-se por uma quantidade de menor animais para os demais grupos: controle negativo, QMA e controle positivo.

Durante o tratamento observou-se redução, não significativa, do peso dos

camundongos apenas na primeira semana de tratamento para o grupo AB quando administrada a dose de 2,5 mg/kg/dia, nos demais grupos essa redução não foi observada. Ribeiro *et al.* (2014) em estudo com nanopartículas de quitosana e sulfato de condroitina como carregador de AB, também observaram redução do peso nos camundongos BALB/c devido à toxicidade de AB quando administrada isoladamente.

A redução do diâmetro das patas lesionadas dos animais foi estatisticamente significante ao término do tratamento, cerca de 60% menor para o grupo QMA-AB em relação aos grupos QMA e AB acompanhada de cicatrização tecidual.

Os resultados das dosagens de ureia e creatinina apresentaram-se dentro dos parâmetros normais assim como os parâmetros hematológicos, embora na prática clínica durante o curso do tratamento com AB, a nefrotoxicidade foi constatada por meio de concentrações séricas elevadas de creatinina muitas vezes até três vezes o limite superior da normalidade (Walsh *et al.*, 1999), assim como anemia e outros efeitos adversos como febre, calafrios, cefaleia, hipocalcemia, hipomagnesemia, leucopenia e flebite (Amato *et al.*, 2007).

As doses gradativas do fármaco administrado geralmente podem potencializar a resposta à medida que a dose aumenta (Brunton *et al.*, 2007).

Talvez a eficácia parcial do tratamento dos camundongos com AB no presente estudo esteja relacionada à baixa concentração administrada que, conseqüentemente, levou à diminuição das alterações renais e o aumento das alterações hepáticas de menor gravidade, como esteatose (19%) e nódulos inflamatórios (75%). Ao tratar os animais infectados, foi adotado o protocolo de administração das formulações QMA, AB e QMA-AB com intervalos de 48 horas, três vezes por semana durante quatro semanas. Este protocolo garantiu a sobrevida

dos animais. O grupo tratado com QMA-AB com dose elevada, 17,5 mg/kg/dia, surpreendentemente apresentou percentual de normalidade de 85% e 65% acerca das alterações renais e hepáticas respectivamente. Os resultados aqui apresentados suportam a tese de que AB, quando transportada por lipídios, atinge concentrações mais elevadas no fígado e no baço, mas nos rins, os níveis são mais baixos. Isto explica a reduzida nefrotoxicidade das preparações lipídicas, que, por outro lado, são discretamente mais hepatotóxicas do que as medicações convencionais (Martinez, 2006). Porém, em estudo recente (Santos, 2018) que avaliou a eficácia e segurança da anfotericina B lipossomal no tratamento da leishmaniose mucosa em humanos, relatou uma taxa de toxicidade renal aguda em 57,1% dos pacientes em relação aos outros tratamentos, sendo que em 87% dos pacientes o tratamento com AB teve que ser interrompido.

As doses totais de QMA-AB (1 mg/mL) e AB (5 mg/mL) administradas nos camundongos de 20 g foram de 4,2 mg e 0,6 mg, respectivamente.

A progressão da doença em modelos animais de *Leishmania* é tradicionalmente feita por uma combinação de medir a espessura da pata e quantificar diretamente os parasitos por diluição limitante (Antonia *et al.*, 2018) ou ainda por quantificação por método molecular.

O tamanho do genoma das *Leishmanias* varia de 29 Mb a 33 Mb, organizado em um número variável de cromossomos, de 34 a 36 (Cantacessi *et al.*, 2015; Real *et al.*, 2013). Apesar das diferenças biológicas entre as espécies de *Leishmania*, incluindo sua associação com diferentes manifestações, há alta similaridade entre seu genoma, com um elevado grau de conservação no conteúdo genético e estrutura (Peacock *et al.*, 2007; Real *et al.*, 2013; Cantacessi *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2017),

portanto a escolha do primer utilizado foi fundamental para o bom desempenho da reação de qPCR. Coincidentemente o primer kDNA 1 de *L. amazonensis* foi desenhado por Weirather *et al.* (2011), a partir da sequência parcial de *L. amazonensis* MHOM/BR/73/M2269 depositada no *GenBank*, acesso U19810.1, a mesma cepa utilizada nos experimentos do estudo.

Na padronização da qPCR do presente estudo, foi possível detectar 0,1 do parasito. O coeficiente de variação das curvas interensaios indicaram alta reprodutibilidade, sendo que a maior variação foi observada com pouca quantidade de parasitos. Além da avaliação clínica foi realizada a quantificação absoluta dos parasitos das amostras de tecido das patas dos animais por método molecular qPCR *Real Time SYBR Green* utilizando kDNA 1 de *L. amazonensis*, que no presente estudo, não amplificou outras cepas de *Leishmanias* testadas apresentando 100% de especificidade. A alta especificidade dos iniciadores não levou a valores superestimados ou falso positivos.

Gomes *et al.* (2017) compararam a acurácia da qPCR usando o *SYBR Green* e *TaqMan* para o diagnóstico de CL e ML a partir de amostras de esfregaços e biópsias usando dois conjuntos de primers/sonda direcionada ao *L. (Viannia)* kDNA, atingindo 100% especificidade para ambas as metodologias e tipos de amostra. O método *SYBR Green* é um método com boa sensibilidade e custo acessível. A formulação QMA-AB foi mais efetiva que AB em relação à redução do tamanho do diâmetro das patas lesionadas. Os animais tratados com QMA-AB apresentaram uma redução de 95% do número de parasitos quantificados na qPCR, o que demonstra claramente o sucesso do tratamento com QMA-AB.

Nos últimos anos, as ciências dos materiais e as ciências biomédicas

produziram numerosos novos sistemas e materiais com potencial para tratar doenças, portanto devem ser consideradas algumas limitações. Há muitos relatos de *drug delivery systems*, em que o aumento da complexidade parece ser visto como uma vantagem, sem qualquer justificativa real em termos do equilíbrio entre complexidade e viabilidade. Os custos elevados desses sistemas serão aceitáveis se o desempenho dos mesmos for suficientemente melhor, reduzindo assim o período de tratamento e o custo geral, levando a economia para o sistema de saúde (Bruni *et al.*, 2017).

No presente estudo, os ensaios pré-clínicos foram imprescindíveis na avaliação da toxicidade e na resposta ao tratamento. Os modelos experimentais reproduzem patologias que acometem humanos e possibilitam avaliar a resposta terapêutica empregada e a patogênese. Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* e principalmente *in vivo* com a nanopartícula lipídica semelhante ao quilomícron foram favoráveis e sugerem que esta inovação tecnológica, de baixo custo, seja uma alternativa promissora de *drug delivery systems* e com aplicabilidade em estudos clínicos, os quais devem seguir os protocolos éticos em pesquisa clínica adequados para avaliação da segurança e eficácia no tratamento da leishmaniose tegumentar em humanos.

6 CONCLUSÕES

- A formulação QMA-AB apresentou maior a atividade leishmanicida que AB contra formas promastigotas

- As formas promastigotas tratadas com a formulação QMA-AB e submetidas à microscopia eletrônica, apresentaram alterações significativas das suas estruturas e organelas celulares.

- Nos testes de citotoxicidade, os macrófagos J774 tratados com a formulação QMA-AB apresentaram maior viabilidade celular comparada à AB que, por sua vez, foi mais tóxica para as células com concentração inferior.

- A formulação QMA-AB com baixa concentração também foi eficaz em relação à taxa de infecção apresentando expressiva redução dos parasitos intracelulares frente ao controle negativo e aos macrófagos infectados tratados com QMA e AB.

- A nanopartícula QMA isoladamente não apresentou citotoxicidade em promastigotas e macrófagos J774.

- Os testes de toxicidade *in vivo* integrados às análises histopatológicas foram fundamentais para o encontro das concentrações das formulações QMA-AB e AB a serem administradas, 17,5 mg/kg/dia e 2,5 mg/kg/dia respectivamente, garantindo a sobrevivência dos camundongos durante o período do tratamento e sem a ocorrência de mutilações dos membros.

- A administração da formulação QMA-AB em concentração elevada foi mais eficaz no tratamento do que AB reduzindo significativamente o diâmetro das patas dos animais.

- As doses utilizadas no tratamento dos animais não refletiram no aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina. Os parâmetros hematológicos apresentaram-

se normais sem sinais de toxicidade. De um modo geral, AB foi o grupo que demonstrou mais alterações histológicas, esteatose e nódulos inflamatórios.

- O método molecular de quantificação absoluta por qPCR foi útil no monitoramento do tratamento.

- A cicatrização das lesões das patas dos animais tratados com a formulação QMA-AB foi acompanhada de significativa redução da carga parasitária.

- A nanoemulsão lipídica semelhante ao quilomícron utilizada no presente estudo, apresentou-se como uma alternativa promissora com grande potencial para o tratamento de leishmaniose tegumentar devido, sobretudo, à sua alta eficácia, reduzida toxicidade, além da estabilidade e o baixo custo na sua produção.

Anexo A - Aprovação do Projeto

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 04/12/14, **APROVOU** o documento abaixo mencionado, datado de 03/12/14, para o Protocolo de Pesquisa nº **425/12**, intitulado: **“UMA NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA VETORIZAÇÃO DE ANFOTERICINA”** apresentado pelo Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

- Inclusão da bióloga **Regina Maia de Sousa**, candidata a Pós-graduação como **pesquisadora executante**

Pesquisador (a) Responsável: **Valdir Sabbaga Amato**

CEUA-FMUSP, 04 de Dezembro de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
 CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
 Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 05 de Fevereiro de 2016

Ilmo(a)
Dr(a). Prof. Dr. Valdir Sabbaga Amato
 (aos cuidados de Regina Maia de Souza)

Certificamos que o projeto intitulado "UTILIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO LIPÍDICA NO TRATAMENTO EXPERIMENTAL DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA", protocolo nº 000325A, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Valdir Sabbaga Amato** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Vigência do Projeto: 09/11/2015 a 09/11/2019							
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Material	Quantidade		
					M	F	M+F
Camundongo isogênico	balb/c	6 a 7 semanas	20 gramas	a ser Coletado	60	0	60
Origem: Biotério - Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo					TOTAL		60

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
 Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 07 de Dezembro de 2015

Ilmo(a)

Dr(a). Prof.Dr.Valdir Sabbaga Amato
(aos cuidados de Regina Maia de Souza)

Certificamos que o projeto intitulado "**Quantificação da Carga Parasitária das Lesões de Camundongos BALB/C Tratados com Anfotericina B desoxicolato associada à nanoemulsão Lipídica (LDE-AB)**", protocolo nº 000327A, sob a responsabilidade de **Prof.Dr.Valdir Sabbaga Amato** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

8 REFERÊNCIAS

Ahmad A, Wei Y, Syed F, Khan S, Khan GM, Tahir K, Khan AU, Raza M, Khan FU, Yuan Q. Isatis tinctoria mediated synthesis of amphotericin B-bound silver nanoparticles with enhanced photoinduced antileishmanial activity: A novel green approach. *J Photochem Photobiol B*. 2016;161:17-24.

Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno DA. historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;3;10(3):e0004349.

Al-Abdely HM, Graybill JR, Loebenberg D, Melby PC. Eficácia do triazol SCH 56592 contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania donovani* em leishmanioses viscerais e cutâneas murinas experimentais. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:2910-4.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.

Amato VS, Andrade HF, Duarte MI. Leishmaniose mucosa: caracterização in situ da resposta inflamatória do hospedeiro, antes e após o tratamento. *Acta Trop*. 2003;85(1):39-49.

Amato VS, Boulos MI, Amato Neto V, Filomeno LT. The use of a silicone T tube for the treatment of a case of American mucocutaneous leishmaniasis with tracheomalacia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995;28(2):129-30.

Amato VS, Nicodemo AC, Amato JG, Boulos M, Neto VA. Mucocutaneous leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with liposomal amphotericin B (AmBisome) *J Antimicrob Chemother*. 2000;46:341-2.

Amato VS, Tuon FF, Camargo RA, Souza RM, Santos CR, Nicodemo AC. Can we use a lower dose of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal American leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(5):818-9.

Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegão de Camargo R, Duarte MI, Neto VA. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23:1026-34.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:266-74.

Amato VS. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *BEPA - Bol Epidemiol Pau*. 01 fev. 2006.

Antonia AL, Wang L, Ko DC. A real-time PCR assay for quantification of parasite burden in murine models of leishmaniasis. *PeerJ*. 2018;6:e5905.

Anversa L, Tiburcio MGS, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Rev Assoc Med Bras*. 2018; 64(3):281-9.

Asthana S, Jaiswal AK, Gupta PK, Pawar VK, Dube A, Chourasia MK. Immunoadjuvant chemotherapy of visceral leishmaniasis in hamsters using amphotericin B-encapsulated nanoemulsion template-based chitosan nanocapsules. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1714-2.

Ayres DC, Pinto LA, Giorgio S. Efficacy of pentavalent antimony, amphotericin B and miltefosine in *Leishmania amazonensis*-Infected macrophages under normoxic and hypoxic conditions. *J Parasitol*. 2008;94(8):1415-7.

Bagnis CI, Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2002;13(4):481-91.

Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, Wang L, Li C, Fu T, Tan W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine (Lond)*. 2012;7(8):1253-71.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. 2007;64:1-109.

Barbiéri CL, Giorgio S, Merjan AJ, Figueiredo EN. Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. *Infect Immun*. 1993;61(5):2131-7.

Basher A, Maruf S, Nath P, Hasnain MG, Mukit MA, Anuwarul A, Aktar F, Nath R, Hossain AA, Milton AH, Mondal D, Mohammad Sumsuzzaman AK, Rahman R, Faiz MA. Case Report: Treatment of Widespread Nodular Post kala-Azar Dermal Leishmaniasis with Extended-Dose Liposomal Amphotericin B in Bangladesh: A Series of Four Cases. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(4):1111-5.

Bernardes-Silva H, Toffoletto O, Bortolotto LA, Latrilha MC, Krieger EM, Pileggi F, Maranhão RC. Malignant hypertension is accompanied by marked alterations in chylomicron metabolism. *Hypertension.* 1995;26:1207-10.

Bolard J, Joly V, Yeni P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level It's modulation by delivery system. *J Liposome Res.* 1993; 3:409-27.

Borba EF, Bonfá E, Vinagre CG, Ramires JA, Maranhão RC. Chylomicron metabolism is markedly altered in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1033-40.

Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:828-31.

Bruni N, Stella B, Giraudo L, Della Pepa C, Gastaldi D, Dosio F. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:5289-5311.

Brunton LL, Knollman B, Bruce A. *As bases farmacológicas da terapêutica. Goodman & Gilman.* 11ª ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana, 2007.

Caldeira LR, Fernandes FR, Costa DF, Frézard F, Afonso LC, Ferreira LA. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: a new approach for the treatment of leishmaniasis. *Eur J Pharm Sci.* 2015;70:125-31.

Calvo-Alvarez E, Guerrero NA, Alvarez-Velilla R, Prada CF, Requena JM, Punzon C, Llamas MA, Arevalo FJ, Rivas L, Fresno M, Perez-Pertejo Y, Balana-Fouce R, Reguera RM. Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both in vitro and in vivo studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(11):e1927.

Cantacessi C, Dantas-Torres F, Nolan MJ, Otranto D. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol.* 2015;31(3),100-8.

Celeste BJ, Arroyo Sanchez MC, Ramos-Sanchez EM, Castro LG, Lima Costa FA, Goto H. Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90:860-5.

Chakravarty J, Sundar S. Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(2):167-76.

Chávez-Fumagalli MA, Ribeiro TG, Castilho RO, Fernandes SO, Cardoso VN, Coelho CS, Coelho CS, Mendonça DV, Soto M, Tavares CA, Faraco AA, Coelho EA. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48:235-42.

Claborn DM. The biology and control of leishmaniasis vectors. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(2):127-34.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). *Princípios éticos na experimentação animal* [internet]. 2015. [acesso 2015 mar 12]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>.

Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, Veland N, Jara M, Adaui V, Castrillón C, Arévalo J, Moreno J, Cañavate C. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2013;134(3):281-9.

Daneshbod Y, Oryan A, Davarmanesh M, Shirian S, Negahban S, Aledavood A, Davarpanah MA, Soleimanpoor H, Daneshbod K. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(4):478-82

Darole PS, Hegde DD, Nair HA. Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2008;9:122-8.

de Carvalho RF, Ribeiro IF, Miranda-Vilela AL, de Souza Filho J, Martins OP, Cintra e Silva Dde O, Tedesco AC, Lacava ZG, Bão SN, Sampaio RN. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA-DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Exp Parasitol*. 2013;135:217-22.

Filippin FB, Souza LC, Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Rev. Bras. Ciên. Farm*. 2006;42:167-94.

Fuchino H, Sekita S, Mori K, Kawahara N, Satake M, Kiuchi F. A new leishmanicidal saponin from *Brunfelsia grandiflora*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2008;56(1):93-6.

Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RNR, Roselino AM. Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based realtime PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in an area where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is endemic. *J Clin Microbiol.* 2017;55:526-34.

Gondal JA, Swartz RP, Rahman A. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1544-48.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):71-80.

Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(3):230-50.

Guery R, Henry B, Martin-Blondel G, Rouzaud C, Cordoliani F, Harms G, Gangneux J-P, Foulet F, Bourrat E, Baccard M, Morizot G, Consigny P-H, Berry A, Blum J, Lortholary O, Buffet P; French Cutaneous Leishmaniasis Study group & the LeishMan network. Liposomal amphotericin B in travelers with cutaneous and muco-cutaneous leishmaniasis: not a panacea. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 2017;11(11):e0006094.

Gupta PK, Jaiswal AK, Kumar V, Verma A, Dwivedi P, Dube A, Mishra PR. Covalent functionalized self-assembled lipo-polymerosome bearing amphotericin B for better management of leishmaniasis and its toxicity evaluation. *Mol Pharm.* 2014;11:951-63.

Han X, Corson N, Wade-Mercer P, Gelein R, Jiang J, Sahu M, Biswas P, Finkelstein JN, Elder A, Oberdoerster G. Assessing the relevance of in vitro studies in nanotoxicology by examining correlations between in vitro and in vivo data. *Toxicology*. 2012;297(1-3):1-9.

Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(6):897-908.

Hirata MH, Oliveira HC, Quintão EC, Redgrave TG, Maranhão RC. The effects of Triton WR-1339, protamine sulfate and heparin on the plasma removal of emulsion models of chylomicrons and remnants in rats. *Biochim Biophys Acta*. 1987;917(2):344-6.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7276-80.

Hotez PJ, Pecoul B, Rijal S, Boehme C, Aksoy S, Malecela M, Tapia-Conyer R, Reeder JC. Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0003895.

Jadhav MP, Nagarsenker MS, Gaikwad RV, Samad A, Kshirsagar NA. Formulation and Evaluation of Long Circulating Liposomal Amphotericin B: A Scinti-kinetic Study using Tc in BALB/C Mice. *Indian J Pharm Sci*. 2011;73(1):57-64.

Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. Novas infecções por leishmania no mundo e no mundo antigo: uma revisão prática. *Dermatol Clin*. 2015;33(3):579-93.

Kumar R, Sahoo GC, Pandey K, Das V, Das P. Study the effects of PLGA-PEG encapsulated amphotericin B nanoparticle drug delivery system against *Leishmania donovani*. *Drug Deliv*. 2015;22:383-8.

Lainson R, Shaw JJ. *Evolution, classification and geographical distribution*. In: *The leishmaniasis*. Vo. 1. London, Peters W. & Killick-Kendrick R. 1987. p.1-128.

Leon CM, Munoz M, Hernandez C, Ayala MS, Florez C, Teheran A, Cubides JR, Ramirez JD. Analytical performance of four polymerase chain reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six *Leishmania* species DNA in Colombia. *Front Microbiol*. 2017;8:1907.

Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007;73(6):843-7.

Manandhar KD, Yadav TP, Prajapati VK, Kumar S, Rai M, Dube A, Srivastava ON, Sundar S. Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(2):376-80.

Mandell GLB JE, Dulin R. *Principles and practice of infectious diseases*. 5^a ed. New York: Churchill Livingstone, 2000. p. 2831-44.

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling LDL. *Lipids*. 1993;28:691-6.

Maranhão RC, Feres MC, Martins MT, Mesquita CH, Toffoletto O, Vinagre CG, Gianinni SD, Pileggi F. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1996;126(1):15-25.

Maranhão RC, Graziani SR, Yamaguchi N, Melo RF, Latrilha MC, Rodrigues DG, Couto RD, Schreier S, Buzaid AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;49(6):487-98.

Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol*. 2006;32(5):449-60.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30:162-4.

Marzzullo L, Souza LC, Campa A. Effect of amphotericin B associated with a lipid emulsion on the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Gen Pharmacol*. 1997;28(2):203-7.

McElrath MJ, Kaplan G, Nusrat A and Cohn Z. Cutaneous leishmaniasis. The defect in T cell Influx in BALB/c mice. *J Exp Med*. 1987;165(2):546-59.

Michel G, Ferrua B, Lang T, Maddugoda MP, Munro P, Pomares C, Lemichez E, Marty P. Luciferase-expressing *Leishmania infantum* allows the monitoring of amastigote population size, in vivo, ex vivo and in vitro. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(9):e1323.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

Mohamed-Ahmed AH, Brocchini S, Croft SL. Recent advances in development of amphotericin B formulations for the treatment of visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25:695-702

Mondal D, Alvar J, Hasnain MG, Hossain MS, Ghosh D, Huda MM, Nabi SG, Sundar S, Matlashewski G, Arana B. Efficacy and safety of single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in a rural public hospital in Bangladesh: a feasibility study. *Lancet Glob Health.* 2014;2(1):e51-7.

Moreira OC, Yadon ZE, Cupolillo E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. *Acta Trop.* 2018;184:29-37.

Mosimann V, Neumayr A, Paris DH, Blum J. Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: a literature review. *Acta Trop.* 2018;182:246-250.

Murback NDN, Filho GH, Nascimento RAF, Nakazato KRO, Dorval MEMC. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *An Bras Dermatol.*; 2011;86(1):55-63.

Murray HW, Hariprashad J, Fichtl RE. Models of relapse of experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1996;173(4):1041-3.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-77.

Musa AM, Noazin S, Khalil EAG, Modabber F. Immunological stimulation for the treatment of leishmaniasis: a modality worthy of serious consideration. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104(1):1-2.

Nygren J, Svanvik N, Kubista M. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers*. 1998;46(1):39-51.

Olsen SJ, Swerdel MR, Blue B, Clark JM, Bonner DP. Tissue distribution of amphotericin B lipid complex in laboratory animals. *J Pharm Pharmacol*. 1991;43(12):831-5.

Padoveze AF, Maniero F, Oliveira TV, Vitorio TS, Couto RD, Maranhão RC. Effect of a cholesterol-rich diet on the metabolism of the free and esterified cholesterol components of a nanoemulsion that resembles LDL in rabbits. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(2):172-8.

Paloque L, Perez-Berezo T, Abot A, Dalloux-Chioccioli J, Bourgeade-Delmas S, Le Faouder P, Pujo J, Teste MA, Francois JM, Schebb NH, Mainka M, Rolland C, Blanpied C, Dietrich G, Bertrand-Michel J, Deraison C, Valentin A, Cenac N. Polyunsaturated fatty acid metabolites: biosynthesis in *Leishmania* and role in parasite/host interaction. *J Lipid Res*. 2019 Jan 9. pii: jlr.M091736.

Parra MG, Fidalgo LM, Martinez JM, Alvarez AM, Iglesias OV. Leishmanicidal activity of Echinaster (Othilia) echinophorus crude extract. *Rev Inst Med Trop.* 2010;52(2):89-93.

Paul M, Durand R, Fessi H, Rivollet D, Houin R, Astier A, Deniau M. Activity of a new liposomal formulation of amphotericin B against two strains of *Leishmania infantum* in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(8):731-4.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2007;39:839-47.

Real F, Vidal, RO, Carazzolle MF, Mondego JM, Costa GG, Herai RH, Würtele M, de Carvalho LM, Carmonae Ferreira R, Mortara RA, Barbiéri CL, Mieczkowski P, da Silveira JF, Briones MR, Pereira GA, Bahia D,. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res.* 2013;20:567-81.

Redgrave TG, Maranhão RC. Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. *Biochim Biophys Acta* 1985;835:104-12.

- Reimão JQ, Trinconi CT, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Kalil SP, Uliana SR. Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. *J Microbiol Methods*. 2013;93(2):95-101.
- Reithinger R, Dujardin J, Louzir H., Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Leishmaniose cutânea. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:581-96.
- Ribeiro TG, Franca JR, Fuscaldi LL, Santos ML, Duarte MC, Lage PS, Martins VT, Costa LE, Fernandes SO, Cardoso VN, Castilho RO, Soto M, Tavares CA, Faraco AA, Coelho EA, Chávez-Fumagalli MA. An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis. *Int. J. Nanomed*. 2014;9:5341-53.
- Rocio C, Amato VS, Camargo RA, Tuon FF, Nicodemo AC. Liposomal formulation of amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis in HIV-negative patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;108(3):176-8.
- Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1990;71(3):267-75.
- Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, Ouellette M, Olivier M, Papadopolou B. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110(2):195-206.

Santos CRO. *Uso da anfotericina B lipossomal e de outras drogas no tratamento de pacientes com leishmaniose mucosa: análise da experiência em um serviço de referência para o diagnóstico e tratamento das leishmanioses, 2000-2015* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2018.

Santos DCMD, de Souza MLS, Teixeira EM, Alves LL, Vilela JMC, Andrade M, Carvalho MDG, Fernandes AP, Ferreira LAM, Aguiar MMG. A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. *J Drug Target*. 2018;26(4):357-64.

Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. *Parasitology*. 2011;138(4):405-25.

Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):581-92.

Shao K, Huang R, Li J, Han L, Ye L, Lou J, Jiang C. Angiopep-2 modified PE-PEG based polymeric micelles for amphotericin B delivery targeted to the brain. *J Control Release*. 2010;147(1):118-26.

Shaw CD, Carter KC. Drug delivery: lessons to be learnt from Leishmania studies. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9:1531-44.

Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1975;69(3):323-35.

Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1995;33(11):813-23.

Sifontes-Rodríguez S, Monzote-Fidalgo L, Castañedo-Cancio N, Montalvo-Álvarez AM, López-Hernández Y, Diogo NM, Infante-Bourzac JF, Pérez-Martín O, Meneses-Marcel A, García-Trevijano JA, Cabrera-Pérez MÁ. The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against *Leishmania* in vitro and in vivo. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(2):166-73.

Silveira FT, Lainson R, Castro Gomes CM, MD Laurenti, Corbett CE. Competências imunopatogênicas de *Leishmania*. (V.) *braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* em leishmaniose tegumentar americana. *Parasite Immunol*. 2009;31(8):423-31.

Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*. 2012;5(6):485-97.

Socorro S Rosa MS, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, de Almeida Rodrigues I, Soares RM, Souto-Padrón T, Alviano CS, Lopes AH. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(6):1895-901.

Souza LC, Campa A. Pharmacological parameters of intravenously administered amphotericin B in rats: comparison of the conventional formulation with amphotericin B associated with a triglyceride-rich emulsion. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44(1):77-84.

Souza LC, Maranhão RC, Schreier S, Campa A. In-vitro and in-vivo studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with a triglyceride-rich emulsion. *J Antimicrob Chemother.* 1993;32:123-32.

Souza LC, Saldiva PH, Campa A. Lipid emulsion reduces subacute toxicity of amphotericin B: a histopathological study. *Exp Toxicol Pathol.* 2000;52(2):169-75.

Souza RM, Andrade HF Junior, Duarte MI, Braz LM, Schubach AO, Silva FC, Amato VS. Reactivation of cutaneous and mucocutaneous tegumentary leishmaniasis in rheumatoid arthritis patients: an emerging problem? *Rev Trop Inst Med Trop São Paulo.* 2017; 59:1-6.

Sposito AC, Lemos PA, Santos RD, Hueb W, Vinagre CG, Quintella E, Carneiro O, Chapman MJ, Ramires JA, Maranhão RC. Impaired intravascular triglyceride lipolysis constitutes a marker of clinical outcome in patients with stable angina undergoing secondary prevention treatment: a long-term follow-up study. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43(12):2225-32.

Stolf NA, Maranhão RC, Tavares, ER. Use of paclitaxel associated with a lipidic nanoemulsion in rabbits submitted to heterologous heart transplantation. *J Thoracic Cardiovasc.* 2011;141:1542.

Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, Postorino MC, Cosentino S, Serra A, Cacopardo B, Nunnari G. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. *Biomed Res Int.* 2013;2013:805108.

Sundar S, Singh A. Desenvolvimentos recentes e perspectivas futuras no tratamento da leishmaniose visceral. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(3-4):98-109.

Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato Neto. Toll-like receptors and leishmaniasis.V. *InfectImmun*. 2008a;76(3):866-72.

Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Amato Neto V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. São Paulo: Wiley Online Library, 2008b. p. 109-124.

Tuon FF, Santos CR, Cieslinski J, Souza RM, Imamura R, Amato VS. Treatment of mucosal leishmaniasis with amphotericin B lipid complex (ABLC). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018;60:e71.

U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for industry. Considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology [internet]. 2014. [acesso 2018 15 dez]. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/regulatoryinformation/guidances/ucm401695.pdf>.

Valduga CJ, Fernandes DC, LoPrete AC, Azevedo CH, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55(12):1615-22.

Vert M, Doi Y, Hellwich K, Hess M, Hodge P, Kubisa P, Rinaudo M, FSchué F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl Chem*. 2012;84:377-410.

Vinagre CG, Stolf NA, Bocchi E, Maranhão RC. Chylomicron metabolism in patients submitted to cardiac transplantation. *Transplantation*. 2000;69:532-7.

Von Stebut E. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13(3):191-200.

Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C, Hiemenz J, Schwartz C, Bodensteiner D, Pappas P, Seibel N, Greenberg RN, Dummer S, Schuster M, Holcenberg JS. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. *N Engl J Med*. 1999;340(10):764-71.

Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME. Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. *J Clin Microbiol*. 2011;49(11):3892-904.

Wijnant GJ, Van Bocxlaer K, Yardley V, Harris A, Alavijeh M, Silva-Pedrosa R, Antunes S, Mauricio I, Murdan S, Croft SL. Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2018;2(2):223-8.

World Health Organization. Leishmaniasis: the global trend [internet]. 2009 jan 30. [acesso 2018 dez 15]. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/.

Wortmann G, Zapor M, Ressler R, Fraser S, Hartzell J, Pierson J, Weintrob A, Magill A. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(5):1028-33.

Yang S, Zhao Q, Xiang H, Liu M, Zhang Q, Xue W, Song B, Yang S. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of constituents from *Toona sinensis* on human cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2013;13(1):12.

Yang ZL, Li XR, Yang KW, Liu Y. Amphotericin B-loaded poly(ethylene glycol)-poly(lactide) micelles: preparation, freeze-drying, and in vitro release. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85:539-46.

Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release.* 2016;224:86-102.