

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

RECIBO DO
06/01/04
M. L. S.
O. F. L. A. C.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Declaus: 1428813
DBCA: 26773
Traminal: 02

**Atividade biológica de uma nova formulação de
anfotericina B solubilizada em nanofragmentos catiônicos
de bicamada de brometo de dioctadecildimetilamônio**

Nilton Erbet Lincopan Huenuman

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Elsa M. Mamizuka
Co-Orientador:
Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro

São Paulo
2004

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Atividade biológica de uma nova formulação de
anfotericina B solubilizada em nanofragmentos catiônicos
de bicamada de brometo de dioctadecildimetilamônio**

Nilton Erbet Lincopan Huenuman

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Profª. Dra. Elsa M. Mamizuka

Co-Orientador:

Profª. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro

São Paulo

2004

18063

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lincopan, Nilton

L741a Atividade *in vivo* de uma nova formulação de anfotericina B solubilizada em nanofragmentos catiônicos de bicamada de brometo de dioctadecildimetilamônio / Nilton Lincopan. -- São Paulo, 2004.

140p.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Mamizuka, Elsa Masae

Co-orientador: Carmona-Ribeiro, Ana Maria

1. Microbiologia clínica 2. Físico-química 3. Bioquímica clínica 4. Histopatologia 5. Hematologia I. T. II. Mamizuka, Elsa Masae, orientador III. Carmona-Ribeiro, Ana Maria, co-orientador.

616.0756 CDD

Nilton Erbet Lincopan Huenuman

Atividade biológica de uma nova formulação de anfotericina B
solubilizada em nanofragmentos catiônicos de bicamada de
brometo de dioctadecildimetilamônio

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, *17* de *Setembro* de 2004.

O presente trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo "FAPESP" — processo N° 00/03554-7 — sendo desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), e laboratório de Biocolóides do Instituto de Química (IQ-USP), em colaboração com o Laboratório de Hematologia Clínica (FCF-USP) e o Laboratório Clínico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMV-USP), contando com a colaboração dos pesquisadores:

Primavera Borelli, FCF-USP

Ricardo A. Fock, FCF-USP

Juliana K. Amhaz, FCF-USP

Marcia Ono, FCF-USP

Guilherme Durante Cruz, FMVZ-USP

José Luis Guerra, FMVZ-USP

Luis Fernando Pacheco, IQ-USP

Ana Maria Carmona-Ribeiro, IQ-USP

Elsa M. Mamizuka, IQ-USP

Lista de Abreviaturas

Abelcet®	=	ABLC, complexo lipídico de AnB com uma estrutura em forma de tiras "ribbon-like"
Ambisome®	=	Formulação propriamente lipossomal de AnB
Amphocil®	=	Amphotec®, dispersão coloidal de AnB, a qual apresenta-se no formato de discos
AnB	=	Anfotericina B
ASD	=	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	=	<i>American Type Culture Collection</i>
AST (GOT)	=	Aspartato aminotransferase
ALT (GPT)	=	Aspartato aminotransferase
BCG	=	Bacillus Calmette-Guerin
°C	=	Graus Centígrados
CIM	=	Concentração inibitória mínima de um agente antimicrobiano
CFM	=	Concentração fungicida mínima de um agente antifúngico
C	=	Concentração
Ca ⁺⁺	=	Cálcio
CH ₃ OH	=	Metanol
DHP	=	Dihexadecilfosfato de sódio
DODAB	=	Brometo de dioctadecíldimetilamônio
DOC	=	Desoxicolato de sódio
DOD/AnB	=	Suspensão coloidal de AnB 0,05 mg/mL, incorporada em 10 mg/mL de nanofragmentos de bicamada de DODAB
DOC/AnB	=	Anfotericina B solubilizada no sal biliar desoxicolato de sódio (1:2 mol:mol) (Fungizon®)
DMSO	=	Dimetilsulfóxido
DMPC	=	Dimiristoril fosfatidilcolina
DMPG	=	Dimiristoril fosfatidilglicerol
DL50	=	Dose Letal 50
D _z	=	Diâmetro médio (<i>mean zeta-average diameter</i>)
EDTA	=	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	=	<i>US Food and Drug Administration</i>

g	=	Gramma
GUV	=	Vesículas unilamelares gigantes
HDL	=	Lipoproteína de alta densidade
Hg(NO ₃) ₂	=	Nitrato de mercúrio
HU	=	Hospital Universitário
H&E	=	Hematoxilina/eosina
h	=	Hora
IL-1	=	Interleucina 1
IP	=	Intraperitoneal
IUPAC	=	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
i.v.	=	Intravenoso
Kg	=	Kilograma
L	=	Litro
LUV	=	Vesículas unilamelares grandes
M	=	Molar
Mcps	=	<i>Mega counts per seconds</i>
Mg ⁺⁺	=	Magnésio
MHC	=	Sistema maior de histocompatibilidade
mg	=	Miligrama
mL	=	Mililitro
MLV	=	Vesículas multilamelares
mm	=	Milímetro
NaCl	=	Cloreto de sódio
NCCLS	=	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NNIS	=	<i>National Nosocomial Infection Surveillance</i>
nm	=	Nanômetro
PBS	=	Tampão fosfato salino
PCS	=	Espectroscopia de correlação de fótons
R	=	Resistente
S	=	Sensível
SCOPE	=	<i>Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance</i>
SF	=	Solução fisiológica
SUV	=	Vesículas unilamelares pequenas
T _c	=	Temperatura de transição de fase
UFC	=	Unidades Formadoras de Colônias
USP	=	Universidade de São Paulo

UTI	=	Unidade de Terapia Intensiva
UV	=	Ultravioleta
V	=	Volume
μg	=	Micrograma
μL	=	Microlitro
μM	=	Micromolar
μm	=	Micrômetro
$\lambda_{\text{máx}}$	=	Absorção máxima
(ϵ)	=	Absorptividade molar

*À Adriana, pelo seu apoio,
compreensão, carinho, amor
e companheirismo incondicional.*

*A minha Mãe, que descansa em paz,
por ter-me ensinado os valores morais e
constante espírito de luta e superação.*

*A minha orientadora Profa. Dra. Elsa M. Mamizuka,
pela grande oportunidade de crescer profissionalmente
e pelo seu apoio constante nos bons e maus momentos.*

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

*A minha co-orientadora Profa. Dra.
Ana Maria Carmona Ribeiro pela oportunidade
de acrescentar novos conceitos na minha formação
e poder ser parte do seu grupo de pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Em especial ao Prof. Dr. Heriberto Fernandez e Profa. Dra. Marlene Barros de Assis por ajudar-me a concretizar o sono de ingressar no mundo da pesquisa científica.

Em especial à Profa. Dra. Marina B. Martinez, pela sua confiança, apoio e credibilidade da minha capacidade profissional.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Clínica e Alimentos que têm sido parte de uma nova família no meu dia-a-dia: Cristina, Cristiano, Diogo, John, Cristina, Carol, Carla, Juliana, Antônio, Jane, Priscila, Doroti.

Aos colegas do laboratório de Biocolóides que têm passado a formar parte de uma nova etapa da minha carreira profissional: Luis Fernando, Débora, Edla, Felipe, Sérgio e Cláudia.

A todos os pesquisadores que contribuíram com a realização do presente trabalho: Ricardo A. Fock, Juliana K. Amhaz, Primavera Borelli, Márcia Ono, Guilherme Durante Cruz, José Luis Guerra, Regina e o pessoal do biotério de experimentação animal da FCF.

A todas as pessoas que indiretamente contribuíram a realização deste trabalho: Juan, Celso, Mário e Fernando.

ABSTRACT

Solubilization of amphotericin B (AMB) by dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) bilayer fragments inspired this evaluation of its *in vivo* activity from survival and tissue burden experiments against systemic candidiasis in a mouse model. AMB (≤ 0.1 mg/mL) was simply added to a DODAB powder dispersion in water (10 mg/mL) previously prepared by sonication with tip; organic solvents completely absent. AMB aggregation state was evaluated from UV-visible light absorption and dynamic light scattering for aggregate sizing. AMB was stabilized by the DODAB bilayer fragments in its monomeric form, mixing of AMB and DODAB dispersion in pure water causing disappearance of large water insoluble drug aggregates. From survival experiments, both the bilayer, DOD/AMB, and the traditional deoxycholate/AMB formulation (DOC/AMB), had identical effect when given by the same route at the same dose of 0.4 mg/kg/day given i.p. for 10 days. From spleen and kidneys tissue burden experiments, similar efficacy of both preparations in reducing tissue CFU counting was obtained.

The inexistence of information on DODAB toxicity led us to study the acute, sub-acute and chronic toxicity of the lipidic carrier as well as of the DOD/AMB formulation using previously described treatment. Cytotoxicity to renal epithelial cells as well as hepatic and renal function and histopathological and hematological alterations were evaluated in Swiss webster mice. *In vitro*, DOD/AMB presented the smaller cytotoxicity against the renal cell compared to the conventional DOC/AMB. *In vivo*, after treatment with DOD/AMB the only histological alteration observed in the kidney was the presence of an inflammatory infiltrate in the renal cortical region, while the use of DOC/AMB additionally generated a precocious tubular lesion which progressed to a degenerative glomerular damage. Independent of the incorporation of AMB, DODAB generated a generalised pro-inflammatory (immunostimulant) response with the formation of a granuloma in the site of inoculation, an increase of the splenic capsule and neutrophilia. In summary, DOD/AMB was as effective as DOC/AMB for treating systemic candidiasis in a mouse model and it is cheaper than other commercially available lipidic formulations. The monomeric solubilisation and stabilisation of AMB in the bilayer fragments, without solvents, presents a smaller nephrotoxicity in comparison to DOC/AMB, however, there is the need of modification in order to increase the incorporation of the drug, decreasing the concentration of the amphiphile, thus reducing the adverse effects observed in this study so that this formulation can compete with commercially available ones.

RESUMO

A prévia solubilização de anfotericina B (AnB) no versátil brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), inspirou à avaliação da atividade *in vivo* de uma formulação DOD/AnB, a partir da análise de sobrevivência e o estudo da colonização de órgãos no modelo murino. Nanofragmentos de bicamada obtidos por sonicação com ponteira, empregando 10 mg de DODAB por mL em água Milli-Q, solubilizaram concentrações de AnB $\leq 0,1$ mg/mL, formando uma solução coloidal livre de solventes orgânicos. O estado de solubilização foi avaliado por espectrofotometria UV-visível e espalhamento de luz dinâmico, para medir o tamanho dos agregados. Nesta condição, a AnB foi estabilizada na sua forma monomérica produzindo o desaparecimento dos agregados insolúveis da droga. Em contraste com outras formulações lipídicas, a atividade *in vivo* de DOD/AnB foi equivalente à atividade da tradicional anfotericina B solubilizada em desoxicolato (DOC/AnB), quando administradas intraperitonealmente na dose de 0,4 mg/kg/dia durante 10 dias. Para o baço e rins, o estudo da recuperação de leveduras teve a mesma eficiência em reduzir o número de UFC/gr de tecido.

A inexistência de informações sobre a atividade tóxica associada ao uso de DODAB, nos levou a estudar a toxicidade aguda, subaguda e crônica do carreador lipídico, assim como da formulação DOD/AnB, usando o esquema terapêutico previamente descrito. Foram avaliadas a citotoxicidade para células epiteliais renais, e a função hepática e renal junto com as alterações hematológicas e histopatológicas no modelo Swiss webster. *In vitro*, DOD/AnB apresentou menor citotoxicidade contra células renais em comparação ao convencional DOC/AnB. *In vivo*, após tratamento com DOD/AnB, a única alteração histológica observada no rim foi a presença de um infiltrado inflamatório na região cortical renal, enquanto o uso de DOC/AnB gerou uma precoce lesão tubular progredindo para um dano glomerular degenerativo. Independentemente da incorporação de AnB, DODAB gerou uma resposta pró-inflamatória generalizada (imunoestimulante) com a formação de um granuloma no sítio de inoculação e um aumento da cápsula esplênica, além de neutrofilia. Em resumo, DOD/AnB foi tão efetivo quanto o tratamento com DOC/AnB no tratamento da candidíase sistêmica no modelo murino, sendo mais barato que outras formulações lipídicas disponíveis comercialmente. A solubilização monomérica e estabilização da AnB em fragmentos de bicamada, na ausência de solvente, apresentou menor

nefrotoxicidade em comparação ao DOC/AnB, embora há necessidade de modificações com o objetivo de aumentar a incorporação da droga, diminuindo a concentração do anfílico, reduzindo os efeitos adversos observados no presente estudo, de modo que esta formulação possa competir com aquelas comercialmente disponíveis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Candidíase e tratamento	1
1.2. Drogas antifúngicas.....	4
1.2.1. Azóis.....	4
1.2.2. Polienos	5
1.3. Lipossomos e dispersões lipídicas como carreadores de anfotericina B.....	7
1.4. Bicamadas lipídicas e anfífilicos sintéticos.....	10
1.5. Propriedades associadas ao uso do Brometo de Dioctadecildimetilamônio ...	12
1.5.1. DODAB e atividade imunoadjuvante	13
1.5.2. DODAB e atividade antimicrobiana	15
1.5.3. Nanofragmentos de bicamada de DODAB e antifúngicos.....	16
1.6. Princípios teóricos dos métodos utilizados	17
1.6.1. Espectrofotometria UV-visível: solubilização e estabilidade da AnB.....	17
1.6.2. Espalhamento de luz dinâmico (light scattering): solubilização e estabilidade da Anfotericina B	21
1.6.3. Atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da Anfotericina B	22
1.6.4. Toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> associada ao uso da Anfotericina B	24
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Materiais empregados no experimento	33
4.2. Caracterização físico-química	35
4.2.1. Preparação dos nanofragmentos de bicamada de DODAB.....	36
4.2.2. Microtitulação e determinação da concentração de DODAB	36
4.2.3. Preparação das soluções estoque.....	37
4.2.4. Incorporação da AnB nas dispersões de DODAB 10 mg/mL.....	37
4.2.5. Espectros de absorção da AnB solubilizada em nanofragmentos de bicamada de DODAB 10 mg/mL, DMSO:Metanol (1:1), e água Milli-Q	38

4.2.6. Distribuição de tamanho dos complexos DOD/AnB na formulação (estabilidade de DOD/AnB em função do tempo e temperatura)	39
4.3. Avaliação da atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da formulação DOD/AnB.....	41
4.3.1. Avaliação da atividade <i>in vitro</i>	41
4.3.2. Avaliação da atividade <i>in vivo</i>	47
4.3.2.1. Análise de sobrevivência.....	47
4.3.2.2. Estudo da recuperação das leveduras do baço e rins.....	51
4.3.2.3. Avaliação histopatológica dos rins.....	52
4.4. Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da formulação DOD/AnB.....	53
4.4.1. Toxicidade <i>in vitro</i> contra a linhagem celular epitelial renal: método de captura do vermelho neutro.....	53
4.4.2. Toxicidade <i>in vivo</i> , aguda e crônica, no modelo murino Swiss webster.....	54
4.4.2.1. Anamnese.....	56
4.4.2.2. Testes bioquímicos.....	56
4.4.2.3. Testes hematológicos	57
4.4.2.4. Autópsia e avaliação histopatológica	59
4.5. Análise Estatística.....	60
5. RESULTADOS	61
5.1. Etapa I: Caracterização físico-química da formulação DOD/AnB.....	61
5.1.1. Incorporação da Anfotericina B nas dispersões de DODAB:.....	61
5.1.2. Representação gráfica da solubilização da Anfotericina B em nanofragmentos de bicamada de DODAB, monitorada por espectrofotometria UV-visível	62
5.1.3. A distribuição de tamanhos na formulação DOD/AnB em função do tempo e da temperatura.....	63
5.1.4. O efeito de tempo e da temperatura sobre a distribuição de tamanhos na formulação DOD/AnB.....	64
5.2. Avaliação da atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da formulação DOD/AnB.....	65
5.2.1. Avaliação da atividade <i>in vitro</i>	65
5.2.2. Avaliação da atividade <i>in vivo</i>	66
5.2.2.1. Análise de sobrevivência.....	66
5.2.2.2. Estudo da recuperação das leveduras do baço e rins.....	67
5.2.2.3. Avaliação histopatológica dos rins.....	68

5.3.	Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da formulação DOD/AnB.....	73
5.3.1.	Toxicidade <i>in vitro</i>	73
5.3.2.	Toxicidade <i>in vivo</i> : toxicidade aguda, subaguda e crônica.	74
5.3.2.1.	Sinais de reação adversa visível nos períodos durante e após a administração de cada formulação.	74
5.3.2.2.	Autópsia.....	75
5.3.2.3.	Efeito de DOD/AnB sobre o peso corporal do modelo Swiss webster, durante e após administração i.p. de 0,4 mg/kg/dia x 10 dias.....	76
5.3.2.4.	Testes bioquímicos.....	77
5.3.2.5.	Testes hematológicos	79
5.3.2.5.1.	Hemograma.....	79
5.3.2.5.2.	Esplenograma.....	81
5.3.2.5.3.	Mielograma.....	84
5.3.2.6.	Avaliação histopatológica	86
5.	DISCUSSÃO	92
5.1.	Caracterização físico-química da AnB solubilizada em nanofragmentos de bicamada de DODAB.....	93
5.2.	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> de DOD/AnB	95
5.3.	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> de DOD/AnB	96
5.4.	Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	98
5.4.1.	Toxicidade <i>in vitro</i>	98
5.4.2.	Toxicidade subaguda.....	98
5.4.3.	Toxicidade aguda versus toxicidade crônica por órgão	100
5.4.4.	Considerações finais da ação do brometo de dioctadecildimetilamônio sobre o tecido hemopoético.....	106
5.4.5.	Hipótese sobre a toxicocinética de DODAB e DOD/AnB no modelo murino estudado	108
5.4.6.	Distribuição dos compostos estudados.....	114
5.4.7.	Excreção renal de DODAB, DOD/AmB e DOC/AmB	117
5.4.8.	Considerações finais.....	117
6.	CONCLUSÕES	117
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1. Introdução

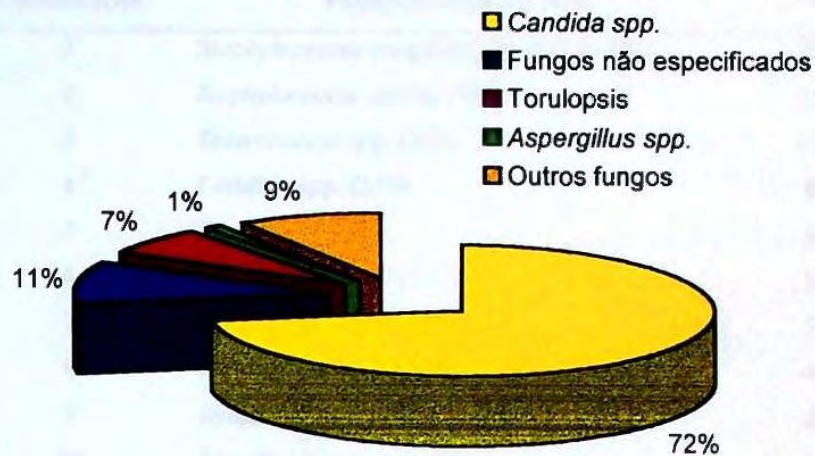
1.1. *Candidíase e tratamento*

Em contraste com agentes antibacterianos, a quantidade de drogas antifúngicas disponível para o tratamento das infecções é muito limitada. A toxicidade seletiva é muito mais difícil de ser atingida nas células fúngicas (eucariotas) do que nas bactérias (procariotas) e, embora os antifúngicos disponíveis apresentem maior atividade para as células fúngicas do que para as células humanas, a diferença não é tão marcante quanto a que ocorre com os agentes antibacterianos.

Por outro lado problemas de solubilidade, estabilidade, e absorção, e os inúmeros efeitos colaterais apresentados por estes agentes, tornaram difícil o seu emprego na terapêutica das infecções fúngicas sistêmicas, de crescente incidência na atualidade, responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidades. Pacientes neutropênicos sob terapias imunossupressivas ou pacientes imunodeprimidos em geral são os que mais sofrem com as candidíases localizadas ou sistêmicas (NUCCI et al., 1998; COLOMBO, 2000).

Os agentes fúngicos de importância clínica podem ser classificados estruturalmente como leveduras, bolores e fungos dimórficos. Epidemiologicamente (gráfico 1) há um predomínio das infecções causadas por fungos leveduriformes do gênero *Candida*, infecção conhecida como candidíase (BECK-SAGUE & JARVIS, 1993; COLOMBO et al., 1999; 2000). Atualmente pode-se citar como referência as Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) americanas, onde a candidíase tem atingido uma frequência (tabela 1) que supera entidades bacterianas clássicas (PFALLER et al., 1998). No Brasil Colombo e colaboradores, num estudo epidemiológico conduzido durante março-2002 a fevereiro-2003, reuniram dados sobre infecções sistêmicas documentadas em quatro hospitais da cidade de São Paulo, avaliando 7.038 episódios de bacteremias e fungemias, na qual *Candida spp* foi responsável por 4,3% do total das infecções examinadas (COLOMBO, 2003).

Gráfico 1. Distribuição de infecções nosocomiais fúngicas por espécie — Center for Disease Control and prevention's National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system —, 1980 – 1990. (BECK-SAGUE & JARVIS, 1993)



Clinicamente, a candidíase pode manifestar-se de diferentes formas — infecção superficial, mucocutânea e sistêmica —, sendo que o prognóstico da infecção está, em geral, diretamente relacionado ao estado imune do hospedeiro, o que define uma infecção do tipo oportunista.

As infecções oportunistas causadas por fungos são principais causas de morte em indivíduos imunocomprometidos (WEY et al., 1988; BODEY et al., 1992; WENZEL, 1995; FRIDKIN & JARVIS, 1996; NUCCI et al., 1998). Nos hospitais, as leveduras são responsáveis por aproximadamente 10% das infecções sistêmicas com um elevado índice de mortalidade (WEY, 1988; WENZEL & PFALLER, 1991; WENZEL, 1995; NUCCI et al., 1998).

Tabela 1. Distribuição dos 10 patógenos mais frequentes isolados das hemoculturas de infecções nosocomiais nos Estados Unidos: Programa de vigilância epidemiológica — *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance* (SCOPE) —, Abril 1995 a Junho de 1996 (PFALLER et al., 1998).

Classificação	Patógenos isolados (n=)	%
1	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i> (1524)	32.3
2	<i>Staphylococcus aureus</i> (787)	16.7
3	<i>Enterococcus</i> spp. (553)	11.7
4	<i>Candida</i> spp. (379)	8.0
5	<i>Escherichia coli</i>	6.4
6	<i>Klebsiella</i> spp. (252)	5.3
7	<i>Pseudomonas</i> spp. (235)	5.0
8	<i>Enterobacter</i> spp. (230)	4.9
9	<i>Streptococcus viridans</i> (139)	2.9
10	<i>Serratia marcescens</i> (67)	1.4
TOTAL	Infecções (4725)	100

O aumento do número de patologias que reduzem a atividade funcional do sistema imune, assim como, a prática de terapias imunossupressoras, tem contribuído no acréscimo da morbidade, porém, os problemas decorrentes do tratamento antifúngico também têm contribuído no índice de mortalidade (COLOMBO et al., 1999; NUCCI et al., 1998). Se por um lado existe um espectro limitado de agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas disseminadas, por outro há restrição na seleção destas drogas devido aos efeitos tóxicos indesejáveis (GONDAL et al., 1989; BRAJTBURG & BOLARD, 1996).

Estes problemas despertaram interesse no decorrer das últimas décadas, ao desenvolvimento de novas estratégias na procura de uma terapia antifúngica segura e efetiva.

A exemplo da organização das membranas biológicas, e sua função celular, a criação de sistemas biomiméticos capazes de carrear antifúngicos foram pioneiros no desenvolvimento dos sistemas de liberação controlada. O sucesso da sua aplicação foi rapidamente extrapolado para inúmeros modelos de compostos terapêuticos, como antitumorais, antibacterianos, enzimas, vacinas, e inclusive na terapia gênica.

Historicamente, o primeiro grande passo nesta linha de pesquisa surgiu após a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas feita por Alec Bangham e colaboradores em 1965 (BANGHAM et al., 1965), sistema o qual receberia o nome de lipossomos três anos mais tarde (SESSA & WEISSMANN 1968). Porém, só em 1971 foi proposta pela primeira vez a utilização dos lipossomos como sistemas carreadores de fármacos (GREGORIADIS et al., 1971), mantendo desde então, um papel preponderante no desenvolvimento desta área.

Os lipossomos são exemplos de sistemas que tiveram uma passagem extremamente rápida do campo da investigação para a aplicação comercial, nas áreas da cosmetologia e farmacologia, sendo que em muitos casos as suas propriedades e eficácia não foram completamente estudadas (GREGORIADIS, 1994; LASIC, 1992).

1.2. Drogas antifúngicas

Antifúngicos incluem uma ampla variedade de substâncias com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação (VANDENBOSSCHE et al., 1987). De forma geral eles podem ser classificados da mesma forma que os antibacterianos (i.e., com base no sítio alvo e na estrutura química) existindo azóis, polienos, 5-fluorocitocina, griseofulvina, alilaminas (terbinafina) e as recentes caspofungina e equinocandinas (micafungina, anidulafungina) (ERNST et al., 1996).

No tratamento da candidíase sistêmica, regimes terapêuticos efetivos contemplam essencialmente azóis e polienos (BEN-JOSEF et al., 1997).

1.2.1. Azóis

Diferentes dos polienos e 5-fluorocitocina, os azóis constituem uma das famílias de antifúngicos com maior número de derivados e com grande diversidade de espectros de atividade, potência e toxicidade (VANDENBOSSCHE et al., 1997). Os azóis são moléculas sintéticas com estruturas químicas e anéis heteropentacíclicos com dois ou três átomos de nitrogênio — imidazóis e triazóis respectivamente —, unidos por átomos de carbono a outros anéis aromáticos (BORGERS, 1980). Eles atuam sobre a célula fúngica interrompendo a síntese do ergosterol (VANDENBOSSCHE, 1997),

principal componente da membrana plasmática dos fungos, ao inibir a enzima lanosterol demetilase dependente do citocromo P-450 (VANDENBOSSCHE et al., 1997; RINGEL, 1990; SAAG, 1988; GRAYBILL, 1989; DROUHET, 1987). Diferente dos polienos, seu efeito é fungistático e não fungicida.

A inibição da biossíntese do ergosterol traz como consequência o acúmulo de esteróis metilados comprometendo a fluidez e permeabilidade da membrana, inibindo o crescimento fúngico (BODEY, 1992).

Como citado este grupo é subdividido em imidazóis (clotrimazol, miconazol, tioconazol, cetoconazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol).

Os imidazólicos como o clotrimazol surgiram primeiramente para uso tópico. Posteriormente foram lançados, para uso sistêmico, o miconazol e cetoconazol. Porém, a elevada hepatotoxicidade associada levou a síntese dos triazólicos, assim, o fluconazol (disponível para uso oral) e o itraconazol apresentaram efeitos tóxicos bastante reduzidos que levaram ao uso massificado destas drogas até os dias de hoje (BENSON & NAHATA, 1988; BODEY, 1992; RICHADSON & WARNOCK, 1993).

1.2.2. Polienos

A anfotericina B (AnB) e a nistatina são compostos poliênicos que ligam-se aos esteróis nas membranas celulares, resultando em extravasamento dos conteúdos celulares e morte celular.

Historicamente a AnB tem sido o tratamento de escolha em infecções fúngicas graves, por ser o único agente fungicida de amplo espectro. Este antifúngico produzido por algumas cepas de *Streptomyces nodosus* age em nível de membrana na célula eucariótica, exercendo seu efeito tóxico pela formação de complexos com o ergosterol, colesterol ou derivados, com os quais forma uma espécie de canal de transmembrana produzindo a liberação de íons e componentes celulares vitais, para a manutenção da integridade celular (ANDREOLI, 1973; GONDAL et al., 1989; BRAJTBURG & BOLARD, 1996). Esta ligação preferencial ao ergosterol em detrimento ao colesterol é a base da toxicidade seletiva.

Adicionalmente a toxicidade da droga tem sido associada a sua insolubilidade, consequência direta da sua hidrofobicidade (LEGRAND et al., 1992) (figura 1).

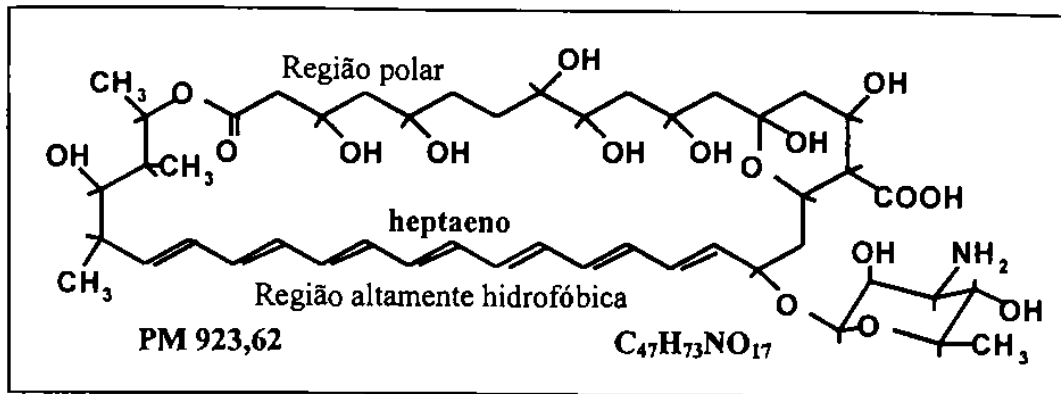


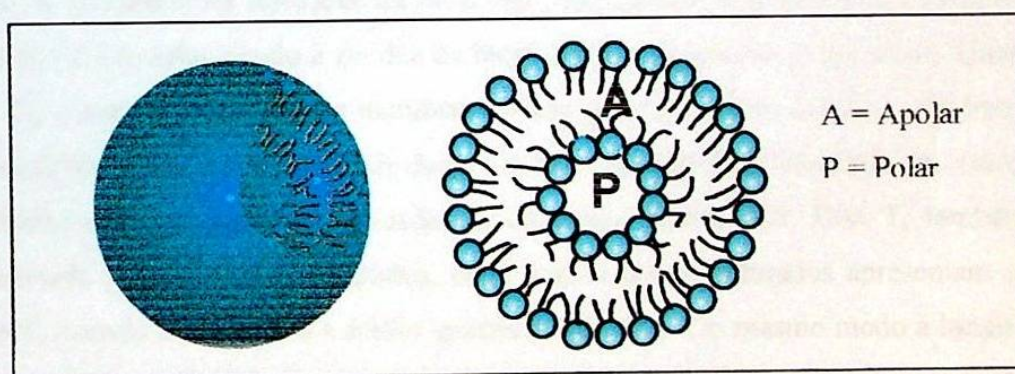
Figura 1. AnB é um antifúngico poliênico de ação fungicida, produzido por algumas cepas de *Streptomyces nodosus*. A droga é insolúvel em água, pouco solúvel em dimetilformamida e solúvel em dimetilsulfóxido, metanol e propilenoglicol. Trata-se de uma substância fotossensível inativada em pH baixo, e com baixa estabilidade. A temperatura de armazenamento varia entre 2° - 8° C. (MARTINDALE, 1996). A distribuição espectral das bandas de absorção (λ) no UV-visível correspondem a uma transição eletrônica nos elétrons dos cromóforos do heptaeno, $\pi \rightarrow \pi^*$.

A baixa solubilidade da AnB nos diferentes solventes orgânicos tem dificultado sua manipulação para fins terapêuticos, sendo comumente administrada em associação ao sal biliar desoxicolato de sódio — Fungizon® —, detergente com o qual forma um complexo micelar instável altamente tóxico (BRAJTBURG & BOLARD, 1996; SCHREIER, 2000). Pelo fato da AnB ser altamente lipofílica, modernas tecnologias baseadas em sistemas de liberação controlada de drogas têm diminuído sua toxicidade, por incorporá-la dentre os carreadores lipídicos sejam estes lipossomos, emulsões lipídicas ou cocleatos, entre outros, mas, a incorporação dentro dos sistemas citados requer administração de doses muito mais elevadas para atingir a mesma efetividade que a formulação comercial Fungizon® (DOC/AnB), além de encarecer o valor do produto, o que finalmente pesa na relação custo/benefício (LOPEZ-BERESTEIN, 1985; GONDAL et al., 1989; CLARK et al., 1991; BRAJTBURG & BOLARD, 1996; BEKERSKY et al., 1999; SOUZA et al., 1993; SOUZA & CAMPA, 1999; DUPONT, 2002; ZARIF et al., 2000).

1.3. *Lipossomos e dispersões lipídicas como carreadores de anfotericina B*

Lipossomos são vesículas microscópicas ou submicroscópicas constituídas de bicamadas concêntricas simples ou múltiplas, resultantes da auto-associação de moléculas anfifílicas (i.e., fosfolipídios) em meio aquoso (figura 2). Nesta organização vesicular os grupos de cabeça polar são localizados na superfície das membranas em contato com o meio aquoso, enquanto que as cadeias hidrocarbonadas formam o centro hidrofóbico das membranas. Pelas suas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, a veiculação de drogas inclui compostos aquosos e/ou lipofílicos (LOPEZ-BERESTEIN, 1987). A incorporação da fase aquosa, com moléculas polares, acontece no interior da vesícula lipídica, enquanto que a solubilização de moléculas hidrofóbicas ocorre nas bicamadas (SCHUBER et al., 1998).

Dentre as principais vantagens como carreadores de antimicrobianos incluem-se as biodegradabilidades, a baixa toxicidade, a possibilidade de solubilizar drogas lipofílicas e hidrofílicas simultaneamente, estabelecendo um efeito sinérgico, e a possibilidade de direcionar seletivamente o alvo, controlando a liberação dos agentes incorporados (LOPEZ-BERESTEIN, 1987).



A associação coloidal de lipídios anfipáticos numa formulação lipossomal pode ser preparada a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídeos sintéticos comercialmente disponíveis.

Taxonomicamente os lipossomos podem ser classificados em termos de tamanho, número de lamelas, constituição lipídica, e carga superficial (LICHTENBERG et al., 1988).

A nomenclatura baseada no número de bicamadas lipídicas (lamelas) e tamanho, diferencia vesículas: multilamelares (MLV) constituídas de cinco ou mais lamelas concêntricas com um diâmetro que varia entre 400-3500 nm (JULIANO, 1981); vesículas unilamelares grandes (LUV) constituídas por uma simples bicamada lipídica de diâmetro superior a 100 nm; vesículas unilamelares pequenas (SUV) idem as anteriores, porém, com um diâmetro entre 20 e 50 nm (LICHTENBERG et al., 1988); e vesículas unilamelares gigantes (GUV) com dimensões superiores a 1 μm podendo chegar às dezenas de micras (LASIC & NEEDHAM, 1995), comparável ao tamanho de uma célula eucariótica.

Uma outra caracterização dos lipossomos compreende a constituição das bicamadas lipídicas. A composição fosfolipídica, a presença de esteróis, a proporção destes componentes lipídicos, e a inserção de outras moléculas nas bicamadas (i.e., anticorpos, polietilenoglicol) vão condicionar diferentes propriedades da membrana como: a carga superficial; estabilidade; e temperatura de transição de fase (T_c) (BAGATTOLLI & GRATTON, 2000).

Com relação à composição, formulações constituídas por lipídeos naturais são mais onerosas que aquelas formadas a partir de lipídeos sintéticos. Por outro lado, a adição de colesterol na formação da bicamada esta diretamente relacionada com a T_c , fenômeno físico relacionado à fluidez da bicamada em função da temperatura. Quando $T^\circ > T_c$, o estado sólido-gel da membrana muda para um estado líquido-cristalino no qual os lipídeos têm maior liberdade de movimento, conferindo à bicamada um aumento da fluidez com subsequente liberação do conteúdo incorporado. Esta T_c também é influenciada pela composição lipídica, onde ácidos graxos saturados apresentam uma maior T_c quando comparados a ácidos graxos insaturados. Do mesmo modo a longitude da cadeia hidrocarbonada do lipídeo é diretamente proporcional a T_c . Este conceito é muito importante no momento de escolher a composição do carreador já que uma $T_c > 37^\circ\text{C}$ garante maior estabilidade da vesícula no organismo com a liberação controlada da(s) droga(s) encapsulada(s), ao contrário uma $T_c < 37^\circ\text{C}$ predispõe a instabilidade da membrana com perda precoce do conteúdo terapêutico.

A carga superficial das vesículas está diretamente relacionada com a capacidade de interagir com moléculas e superfícies de carga oposta. Destacam-se os lipossomos catiônicos os quais são largamente usados na terapia gênica para carregar ácidos nucléicos aniônicos.

Lipossomos catiônicos sintéticos compostos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) são versáteis na sua utilização (CARMONA-RIBEIRO, 2000; 2003). Independente da incorporação de drogas, estes lipossomos podem agir como agentes antimicrobianos, causando morte de bactérias e fungos em concentrações que não afetam linhagens celulares de mamífero (TÁPIAS et al., 1994; SICCHIEROLLI et al., 1995; MARTINS et al., 1997; CARMONA-RIBEIRO et al., 1997; CAMPANHA et al., 1999; CARMONA-RIBEIRO, 2000; 2003).

Com relação aos métodos de preparação, existem diversas técnicas para produzir vesículas, porém, a metodologia escolhida determina as propriedades físicas e funcionais das vesículas ou dos fragmentos de bicamada formados. Para sistemas sintéticos dispersos em solução aquosa (i.e., DODAB), existem os seguintes métodos: 1) sonicação com banho, 2) sonicação com sonda (tip), e 3) vaporização com clorofórmio. O primeiro método resulta na formação de MLV (KUNITAKE et al., 1977), o segundo método resulta na formação de vesículas unilamelares pequenas (SUV) (MORTARA et al., 1978; KANO et al., 1979) ou fragmentos de bicamada (PANSU et al., 1990; CARMONA-RIBEIRO et al., 1991), e o terceiro método resulta na formação de vesículas unilamelares grandes (LUV) (CARMONA-RIBEIRO, 1983; CARMONA-RIBEIRO et al., 1984). Para sistemas naturais (i.e., fosfolípidos), um dos métodos mais utilizados é o de injeção etanólica (BATZRI & KORN, 1973; KREMER et al., 1977).

A primeira formulação lipossomal de AnB foi desenvolvida por LOPEZ-BERESTEIN e colaboradores (LOPEZ-BERESTEIN et al., 1983; 1985; 1987). Nesta formulação a droga foi encapsulada em vesículas multilamelares (MLV) compostas de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoril fosfatidilglicerol (DMPG), numa proporção molar 7:3, com um diâmetro médio das partículas de 0,35 – 6 μm . Mais tarde, derivado do trabalho de LOPEZ-BERESTEIN e com fins de comercialização, surgiu o complexo lipídico ABLC (Abelcet[®]) que utilizou uma fração do lipossomo MLV (DMPC:DMPG) numa concentração molar de AnB de 33 mol%, porém, com maior índice terapêutico que o seu antecessor, e com uma estrutura “*ribbon-like*” (forma de fitas) diferente da formulação original, com diâmetro médio de 1,6 – 11 μm .

A segunda formulação comercializada, Ambisome[®], corresponde a lipossomos SUV com um diâmetro médio de 80 nm. Nesta formulação, a concentração de AnB é 50 mg/350 mg de lipídeo (10 mol%), composição lipídica formada por fosfatidilcolina de

soja hidrogenada, colesterol, e distearoil fosfatidilglicerol (10:5:4) (GONDAL et al., 1989; JANKNEGT et al., 1992; DUPONT, 2002).

Uma terceira formulação coloidal, também disponível no mercado, é conhecida como dispersão coloidal de AnB (ABCD, Amphocil®) Estruturalmente corresponde a um complexo estável de AnB e sulfato de colesterol numa proporção 1:1, com partículas que têm uma estrutura “*disk-like*” com um diâmetro médio de 122 nm (JANKNEGT et al., 1992; DUPONT, 2002).

Em termos terapêuticos, as formulações lipídicas de AnB apresentam a mesma eficácia da formulação convencional Fungizon® — embora para estes fins seja necessária uma dose maior que varia dentre 3 a 5 mg de AnB/kg/dia dependendo da formulação —, porém, com diferenças na incidência de efeitos adversos. Apesar de menos tóxicas, estas formulações apresentam um custo muito alto, inviabilizando seu uso rotineiro como terapêutica inicial de infecções fúngicas.

1.4. Bicamadas lipídicas e anfifílicos sintéticos

Diferentes de lipídeos de cadeia simples que formam micelas, os lipídeos que possuem uma dupla cadeia hidrocarbonada formam bicamadas.

A bicamada lipídica é a estrutura básica comum a todas as membranas biológicas, o mesmo ocorrendo com os lipossomos, que serve como uma barreira impermeável à maioria dos íons e moléculas hidrossolúveis.

A formação de bicamadas lipídicas é um processo de automontagem decorrente de seu caráter anfipático. As interações hidrofóbicas constituem a principal força que direciona a sua formação. Moléculas de água são liberadas das caudas hidrocarbonadas e forças atrativas de van der Waals, entre as caudas, favorecem o íntimo empacotamento da bicamada. Finalmente, há atrações eletrostáticas e pontes de hidrogênio entre as cabeças polares e as moléculas de água. Desse modo, as bicamadas lipídicas são estabilizadas por todo o conjunto de forças que participam nas interações intermoleculares em sistemas biológicos.

Uma das propriedades mais atrativas para o transporte e solubilização de antifúngicos, é que as bicamadas lipídicas tendem a fechar-se sobre si mesmas para que não haja bordas com cadeias hidrocarbônicas expostas ao meio aquoso (hidrofobia).

Deste modo, as bordas hidrofóbicas expostas podem incorporar drogas hidrofóbicas formando dispersões coloidais de fragmentos de bicamada altamente estáveis (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2001; PACHECO & CARMONA-RIBEIRO, 2003; CARMONA-RIBEIRO, 2003).

Um dos modelos de fragmentos de bicamada mais estudados tem utilizado anfífilicos sintéticos obtidos por sonicação com tip, como o DODAB (brometo de dioctadecildimetilamônio) e o DHP (dihexadecilfosfato de sódio) (CARMONA-RIBEIRO & CHAIMOVICH, 1983; CARMONA-RIBEIRO, 1992; VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2001; PACHECO & CARMONA-RIBEIRO, 2003).

O anfífilico sintético “brometo de dioctadecildimetilamônio” (DODAB, PM 631 g/mol), pertence ao grupo dos amônios quaternários. Estruturalmente possui uma cabeça polar catiônica hidrofílica com um contra-íon monovalente (Br^-), e duas longas cadeias hidrocarbonadas (C_{18}) altamente hidrofóbicas que lhe permitem formar bicamadas em solução aquosa, de modo tal que a interação hidrofóbica induz as moléculas a se associarem expondo a cabeça polar para a fase aquosa (figura 3). A temperatura de transição de fase (T_c) do DODAB disperso em água tem um valor que varia de $36^\circ - 45^\circ\text{C}$, dependendo do protocolo de preparação e da metodologia usada para medir esta T_c . (CARMONA-RIBEIRO & CHAIMOVICH, 1983; BENATTI et al., 1999; FEITOSA et al., 2000).

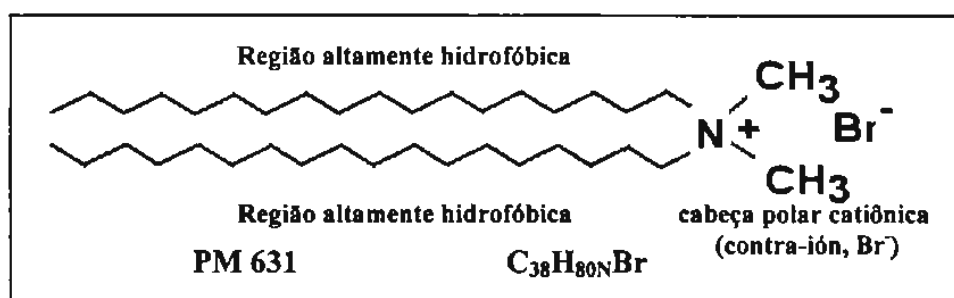


Figura 3. Estrutura do anfífilico sintético Brometo de Dioctadecildimetilamônio.

A versatilidade do DODAB como agente de interface tem sido associado com inúmeras aplicações como: interações com superfícies de carga oposta como células procarióticas (TÁPIAS et al., 1994; SICCHIEROLLI et al., 1995; MARTINS et al., 1997; CAMPANHÃ et al., 1999), eucariotes (CARMONA-RIBEIRO et al., 1997; CAMPANHÃ et al., 2001), proteínas séricas (CARVALHO & CARMONA-RIBEIRO, 1998), polímeros sintéticos como látex (VIEIRA et al., 2003) e superfícies minerais

(CARMONA-RIBEIRO & MIDMORE, 1992; MOURA & CARMONA-RIBEIRO, 2003).

Recentemente estudos físico-químicos têm caracterizado a solubilização de drogas hidrofóbicas como anfotericina B (AnB) e miconazol em nanofragmentos de DODAB, postulando-se que a ampla área hidrofóbica dos fragmentos de bicamada obtida por sonicação com tip oferece uma superfície para a interação com a borda hidrofóbica da AnB ou o miconazol, de tal modo que a borda hidroxilada da droga fica exposta à superfície aquosa (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2001; PACHECO & CARMONA-RIBEIRO, 2003).

1.5. Propriedades associadas ao uso do Brometo de Dioctadecildimetilamônio

Uma outra propriedade promissora bastante explorada tem sido a liberação controlada de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) para células mamíferas, como uma estratégia para imunoterapia e proteção antiviral (KIKUCHI et al., 1999; 2000; LASIC, et al., 1997; van ROOIJ et al., 2002; NANTES et al., 2003). Porém, a principal utilidade terapêutica tem sido associada a sua intrínseca atividade imunoadjuvante e interação com proteínas antigênicas, potencial amplamente estudado por mais de 35 anos (GALL, 1966; VERONESI et al., 1970; STANFIELD et al., 1973; SNIPPE et al., 1980b; HILGERS & SNIPPE, 1992; KATZ et al., 1995; Van ROOIJ; LINDBLAD et al., 1997; TSURUTA et al., 1997; KLINGUER, et al., 2001; KLINGUER-HAMOUR, 2002; 2002; DASCHER et al., 2003; HOLTEN-ANDERSEN et al., 2004; LARSEN et al., 2004), já sendo utilizado em humanos em combinação com o toxóide tetânico (STANFIELD et al., 1973; VERONESI et al., 1970).

1.5.1. DODAB e atividade imunoadjuvante

Adjuvantes são compostos que auxiliam aos antígenos (Ag) no estabelecimento de uma resposta imune precoce e de longa duração. Tais compostos são utilizados na preparação de vacinas favorecendo o custo da produção em grande escala. Atualmente, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, o interesse na procura de novos adjuvantes aumentou muito, uma vez que vacinas desenvolvidas a partir desta tecnologia ou pela extração e purificação de fragmentos subcelulares carecem de efetividade em estimular uma resposta imune protetora. Com o uso de adjuvantes a resposta imune pode ser modulada seletivamente para o sistema maior de histocompatibilidade (MHC) classe I ou MHC classe II, assim como para as populações linfocitárias auxiliares Ta1 ou Ta2, de extrema importância na proteção contra doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares, seja vírus, parasitas ou bactérias como *Mycobacterium* spp. (GUPTA & SIBER, 1995).

Embora, para uso humano, o adjuvante mais utilizado seja o hidróxido de alumínio e o fosfato de alumínio, durante os últimos anos, diversos compostos alternativos vêm sendo testados com resultados alentadores como, por exemplo, emulsões oleosas, saponina, derivados de muramil dipeptidos, monofosforil lipídeo A, lipossomos, QS21, MF-59 e complexos imunoestimulantes (ISCOMS) (GUPTA & SIBER, 1995).

Fazendo parte desta longa lista de novos imunoadjuvantes encontram-se alguns lipídeos catiônicos, com 12 ou mais átomos de carbono e que possuem cabeças polares constituídas por sais de amônio quaternário. Dentre este grupo, a atividade imunoadjuvante do DODAB tem sido a mais promissora (HILGERS & SNIPPE, 1992; KATZ et al., 1995).

Como citada anteriormente esta atividade imunoadjuvante tem sido extensivamente estudada por mais de 35 anos em uma variedade de modelos animais em combinação com diferentes antígenos como: de células eritróides (SNIPPE et al., 1977; HILGERS et al., 1986), células tumorais (PRAGER et al., 1985), proteínas antigênicas (GALL, 1966), haptenos (SNIPPE et al., 1978), vírus (KRAAIJVEL et al., 1980; 1983; KATZ et al., 1991; KLINGUER-HAMOUR et al., 2002), e antígenos bacterianos (LINDBLAND et al., 1997; TSURUTA et al., 1997; BRANDT et al., 2000; OLSEN et al., 2001; DASCHER et al., 2003; HOLTEN-ANDERSEN et al., 2004).

Em contraste a outros adjuvantes estudados, a toxicidade do DODAB em humanos parece ser baixa (VERONESI et al., 1970; STANFIELD & BRACKEN, 1973), porém, frente à inexistência de maiores estudos, faz-se necessárias pesquisas adicionais que permitam o uso seguro deste anfifílico. Geralmente, no local de inoculação tem sido relatada a formação de depósitos que desaparecem com o tempo, similar àqueles produzidos pela administração da BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*, vacina produzida a partir de uma cepa de *Mycobacterium bovis* atenuada).

O tipo de resposta associada ao uso de DODAB descreve a indução de hipersensibilidade retardada e a produção de uma resposta imune humoral, as quais conferem uma resistência contra uma posterior infecção (i.e., vírus patogênicos), como avaliado em modelos animais (Van ROOIJ et al., 2002).

Estas respostas imunes têm sido atribuídas à capacidade do DODAB de induzir uma resposta inflamatória com a subsequente síntese e liberação de IL-1 e interferons que favorecem a reclusão e ativação de células mononucleares, levando a um processo estimulatório generalizado (HILGERS & SNIPPE, 1992).

Esta atividade é independente da rota de administração, assim o DODAB tem mostrado efeito adjuvante após a administração subcutânea (LINDBLAD et al., 1997; TSURUTA et al., 1997; HOLTEN-ANDERSEN et al., 2004), intramuscular (KLINGUER-HAMOUR et al., 2002; DASCHER et al., 2003), e intranasal (KLINGUER et al., 2001).

Embora o mecanismo de ação sobre a proteína antigênica ainda não tenha sido completamente esclarecido, a atividade adjuvante pode estar associada ao aumento da hidrofobicidade da proteína complexada, ou à mudança da carga superficial do antígeno, cationização que levaria ao acréscimo da imunogenicidade (HILGERS & SNIPPE, 1992; MUCKERHEIDE et al., 1987).

Na tentativa de esclarecer este dilema, um estudo realizado por TSURUTA e colaboradores, utilizando como modelo a proteína HSP de *M. leprae* (18 kDa) incorporada em vesículas de DODAB, revelou que, em água, a incorporação do antígeno é o produto da força de atração eletrostática e da força de atração hidrofóbica. Esta interação faz com que esta proteína seja incorporada na bicamada com a subsequente liberação do conteúdo interno, como avaliado por ensaios de diálises e marcação radioativa do compartimento aquoso interno das vesículas. No entanto, quando se utiliza PBS (tampão fosfato salino pH 7.0) como descrito nos protocolos de preparação destes adjuvantes, nota-se que a incorporação é exclusivamente o produto da

força de atração hidrofóbica, embora não ocorra a inserção da proteína na bicamada, observado pela ausência de vazamento do conteúdo aquoso interno. Neste último caso, foi sugerida uma incorporação “lying-over” do antígeno, incorporação que explicaria a ausência de vazamento e a elevada efetividade na apresentação do antígeno para o sistema imune. Tal efetividade foi avaliada pelo aumento da resposta de hipersensibilidade retardada no modelo murino BALB/c (TSURUTA et al., 1997).

1.5.2. DODAB e atividade antimicrobiana

Vesículas de DODAB são bactericidas (TÁPIAS et al., 1994; SICCHIEROLLI et al., 1995; MARTINS et al., 1997; CAMPANHÃ et al., 1999), em concentrações que praticamente não afetam células de mamíferos em cultura (CARMONA-RIBEIRO, 1997). Quando vesículas catiônicas de DODAB interagem com a superfície irregular carregada negativamente de *Escherichia coli*, DODAB induz floculação das bactérias para densidades numéricas altas (a partir de 10^7 /mL) e mata *E. coli* em concentrações de décimos de micromolar (TÁPIAS et al., 1994; SICCHIEROLLI et al., 1995).

Os principais aspectos físico-químicos da interação entre vesículas catiônicas de DODAB e *E. coli* já foram descritos (TÁPIAS et al., 1994). Isotermas de adsorção obtidas foram de alta afinidade (adsorção não reversível). Cálculos para a adesão de uma paliçada de vesículas íntegras sobre as bactérias resultaram em valores consistentes com a adesão experimental limite. Observou-se ainda, uma agregação bacteriana induzida pelas vesículas catiônicas tanto por turbidimetria quanto por microscopia óptica (TÁPIAS et al., 1994; SICCHIEROLLI et al., 1995). A ação floculante das vesículas de DODAB foi quantificada, observando-se floculação rápida (com meia vida de minutos) a partir de 10^7 bactérias por mL (SICCHIEROLLI et al., 1995). A morte celular mostrou-se dissociada do fenômeno de agregação, ocorrendo também para células não agregadas (SICCHIEROLLI et al., 1995).

O fato das vesículas no estado gel rígido não se desintegrarem na adsorção à superfície celular bacteriana, é de considerável significância para entrega por endocitose, de vesículas contendo drogas dentro do compartimento aquoso.

Mais tarde, a ação bactericida do DODAB foi demonstrada estender-se a outras espécies bacterianas de importância clínica como *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, além da *E. coli* (MARTINS et al.,

1997). A susceptibilidade das quatro espécies bacterianas ao DODAB foi demonstrada e comparada, através de curvas de viabilidade celular (CAMPANHÃ et al., 1999). Foi estabelecida a relação de troca de carga da superfície celular das bactérias, demonstrando-se que quando essa superfície encontrava-se positiva, as bactérias apresentavam viabilidade em torno de 0%.

A ação antimicrobiana das vesículas de DODAB foi estendida aos fungos. A ação antifúngica do DODAB foi estudada para *Candida albicans*, através de curvas de viabilidade celular (CAMPANHÃ et al., 2001). DODAB mostrou ser fungistático para a concentração de 1 mM, comprovando sua toxicidade diferencial.

1.5.3. Nanofragmentos de bicamada de DODAB e antifúngicos

A solubilização de duas drogas antifúngicas hidrofóbicas, anfotericina B e miconazol em vesículas pequenas de DODAB, e fragmentos de bicamada, mostrou a possibilidade de utilizar o DODAB como carreador destas drogas (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2001; PACHECO & CARMONA-RIBEIRO, 2003).

No trabalho de VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, estudos físico-químicos caracterizaram a solubilização de AnB, em nanofragmentos de DODAB ou DHP, avaliada por espectrofotometria UV-visível e distribuição dos tamanhos nas misturas por espalhamento de luz dinâmica (*dynamic light scattering*). Após a interação, o espectro de absorção UV da AnB solubilizada nos fragmentos de DODAB (D , diâmetro médio, 86.1 ± 3.6 nm) foi similar ao obtido pela solubilização da droga na mistura dos solventes orgânicos DMSO:metanol (1:1). Adicionalmente a distribuição de tamanhos na dispersão DODAB-AnB (DODAB + AnB, $D = 74.9 \pm 0.6$ nm) revelou o desaparecimento dos agregados insolúveis de AnB (AnB + água Milli-Q, $D = 433.1 \pm 16.6$ nm), postulando-se que a ampla área hidrofóbica dos fragmentos de bicamada obtidos por sonicação com tip oferecem uma superfície para a interação com a borda hidrofóbica da AnB, de tal modo que a borda hidroxilada da droga fica exposta à superfície aquosa, propondo-se um modelo econômico de liberação controlada (figura 4) (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2001). Mais tarde, estes experimentos foram extrapolados para outro antifúngico altamente tóxico e insolúvel, o miconazol, obtendo-se idênticos resultados. (PACHECO & CARMONA-RIBEIRO, 2003).

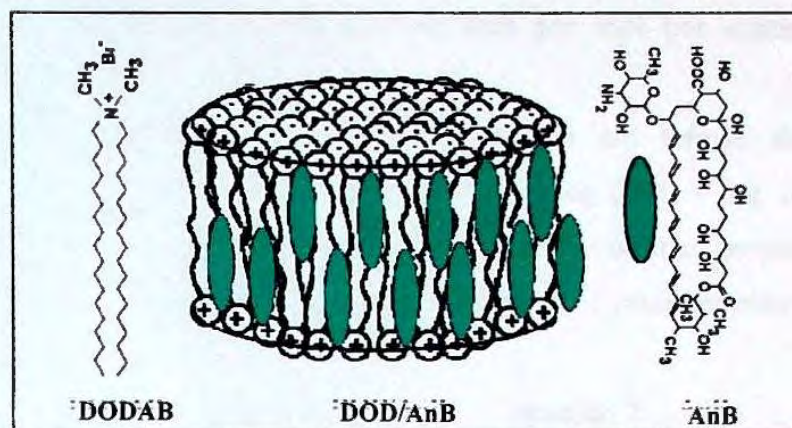


Figura 4. Solubilização de AnB em nanofragmentos de bicamada de DODAB. Diâmetro médio 90 nm (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2001).

1.6. Princípios teóricos dos métodos utilizados

1.6.1. Espectrofotometria UV-visível: solubilização e estabilidade da Anfotericina B.

A espectrofotometria utiliza a teoria proposta por Lord Rayleigh em 1971 na qual partículas dispersas em um meio qualquer atuam como fonte de luz secundária. A radiação eletromagnética interage com a partícula situada no meio induzindo oscilações em sua nuvem eletrônica. Estas oscilações geram dipolos, onde os elétrons da partícula se alinham em um plano do campo eletromagnético. Com a oscilação do campo ocorre a aceleração da carga (nuvem eletrônica), e de acordo com o eletromagnetismo clássico, a aceleração de uma carga leva à emissão de radiação que pode ser medido num sistema óptico como o espectrofotômetro, o qual é constituído por uma fonte de luz, célula de medida, e detectores da luz espalhada (HIEMENZ, 1977; PAVIA et al., 1979).

O espalhamento de luz é usado em soluções diluídas. Em tais circunstâncias, a lei de Lambert-Beer aplicada aos processos de absorção:

$$I = I_0 e^{-\epsilon l c} = I_0 10^{-\epsilon l c} = t \quad \text{equação 1}$$

Onde: I_0 é a intensidade de luz incidente; I é a intensidade de luz transmitida através de uma célula de l cm de espessura (l , caminho percorrido) contendo uma solução de concentração c moles/litro (molar, M); ϵ , é o *coeficiente de extinção molar*

ou absorvividade molar em unidades de litro por mol por centímetro; e t é a transmitância.

Freqüentemente os dados são apresentados em termos de transmitância percentual ($I_0/I \times 100\%$) ou em absorbância [$A = \log (I_0/I) = \log 1/t$], denominada antigamente como densidade óptica "DO". Esta última proposição física é particularmente conveniente, pois, a partir da equação 1 pode ser obtida uma equação mais útil, em termos práticos:

$$A = \epsilon lc \quad \text{equação 2}$$

Simplificando os conceitos físicos, a absorção de luz — UV ou visível — por uma molécula, é o resultado de uma transição eletrônica (excitação de elétrons) onde o espectro de absorção medido diretamente num espectrofotômetro é simplesmente um gráfico da intensidade de absorção (A , absorbância ou T , % de transmitância) versus o comprimento de onda (freqüência). Para medir os espectros de absorção usa-se uma fonte de luz monocromática de comprimento de onda conhecido, que permite inferir o decréscimo de intensidade que ocorre quando a luz passa através de uma solução coloidal analisada. Esta intensidade, expressada como absorbância (A), será proporcional à concentração (C) do composto analisado, originando um gráfico A/C linear, linearidade que se mantém constante até um valor da absorbância igual a 1.0, onde se cumpre a lei de Lambert-Beer (HIEMENZ, 1977).

Um outro conceito que deve ser compreendido para entender os experimentos realizados é que: se uma molécula tem vários cromóforos na sua estrutura o composto terá vários espectros, absorvendo em diferentes comprimentos de onda. Por outro lado, se uma série de compostos tiver o mesmo cromóforo, os espectros da série serão muito parecidos, absorvendo quase no mesmo comprimento de onda (ALLINGER et al., 1978; PAVIA et al., 1979). Chama-se cromóforo a um grupo de átomos insaturado e covalente que apresenta absorção característica na região do UV ou do visível (190 – 800 nm) (ALLINGER et al., 1978; PAVIA et al., 1979). Se dois (ou mais) grupos cromóforos de uma molécula estiveram separados por duas ou mais ligações simples o espectro no ultravioleta será, em geral, a adição simples dos espectros dos dois cromóforos. Agora, se dois cromóforos forem conjugados, eles passam a se comportar como um novo cromóforo, e produz-se diferença marcante no espectro. A conjugação adicional com outro cromóforo resulta em um novo deslocamento da longitude de onda para o vermelho acompanhado de um aumento de intensidade na absorção. Este efeito batocrômico (de defasagem) da conjugação dependente da sua extensão, num sistema de

enlace duplo onde, quanto maior a longitude da cadeia do polieno, menor será a energia necessária para produzir a transição de um orbital ocupado para um nível de energia eletrônico maior não ocupado (figura 5). Um exemplo extremo é o dos carotenóides que contém muitas duplas ligações conjugadas, e são, por isto, muito coloridos. Finalmente os compostos que contém uma série de cromóforos conjugados serão coloridos se absorverem acima de 400 nm (ALLINGER et al., 1978; PAVIA et al., 1979).

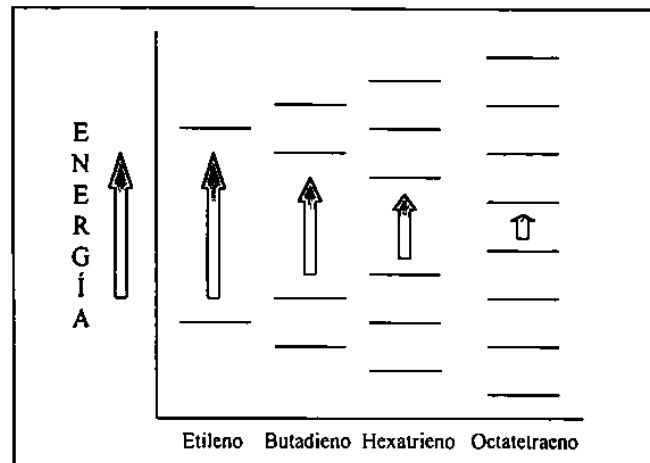


Figura 5. Comparação da energia necessária para produzir a transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ numa série de polienos com distintas longitudes na extensão da suas cadeias.

Assim, além de poder determinar a concentração de um composto, como por exemplo a dosagem de parâmetros bioquímicos clínicos, ou a dosagem de drogas, uma outra propriedade da espectrofotometria nasce do princípio de que: modificações espectrais de um composto — provocadas pela ação da luz — correspondem a modificações na sua estrutura, concebidas pelo seu estado de solubilização (monômero solúvel ou agregado insolúvel), modificações as quais refletem no processo de absorção da luz (deslocamento do máximo de absorção, $\lambda_{m\acute{a}x}$).

Para anfotericina B, a forma e distribuição espectral das bandas de absorção (λ) correspondem a uma transição eletrônica nos elétrons dos cromóforos do heptaeno ($\pi \rightarrow \pi^*$, passagem de um orbital molecular de baixo nível de energia, π , para um orbital molecular de alto nível de energia, π^* ,) (figura 1) (FLOREY, 1977). Quando há uma interrupção na conjugação dos cromóforos pela agregação da droga, esta distribuição espectral será afetada.

Suspensões aquosas de AnB podem apresentar três estados de agregação, podendo coexistir, sendo elas: os monômeros e os oligômeros, ambas solúveis em água; e ainda agregados de oligômeros, não solúveis em água (LEGRAND et al., 1992). Cada

uma destas formas pode ser caracterizadas por diferenças em seus espectros ópticos de absorção UV-visível numa amplitude de longitude de onda de 280 - 450 nm. Geralmente as formas monoméricas podem ser obtidas quando a droga é solubilizada em solventes orgânicos como DMSO ou metanol, sendo mais freqüentemente usada uma mistura de ambos solventes numa razão de 1:1. Para este estado pode ser observado um máximo de absorção ($\lambda_{máx}$) em torno de 409 - 411 nm com uma absorptividade molar (ϵ) = 120000. Já para formas agregadas de AnB observa-se um máximo de absorção entre aproximadamente 325 e 350 nm (LEGRAND et al., 1992 & BARWICZ et al., 1992).

A importância do estado de agregação da AnB numa formulação tem sido motivo de controvérsias em relação à sua atividade e toxicidade. Atualmente existe um consenso de que formas monoméricas sejam ativas contra células fúngicas, e inativas para hemácias humanas e outro tipo de linhagem celular. Vários pesquisadores têm reportado que a toxicidade de antibióticos administrados como monômeros é mais baixa (GRUDA & DUSSAULT, 1987; BARWICZ et al., 1992).

Assim, como os solventes orgânicos citados anteriormente, alguns surfactantes também podem produzir a monomerização dos antibióticos aumentando sua seletividade celular e reduzindo a sua toxicidade para animais (BARWICZ et al., 1992; BOLARD et al., 1991).

Especificamente, no caso da AnB solubilizada em desoxicolato (DOC) — utilizada na clínica — coexiste uma mistura de micelas de AnB-DOC, agregados de AnB, e DOC puro. Neste sistema coloidal, a alta concentração de DOC formador de micelas puras, estabiliza os minúsculos agregados de AnB — agregados solúveis — assim como estabiliza as micelas mistas “AnB-DOC”. Este sistema é altamente instável decompondo em agregados insolúveis de AnB e micelas de DOC. A instabilidade é tão grande que uma diluição, como aquela realizada para a administração sistêmica, é suficiente para perder o equilíbrio termodinâmico produzindo a rápida decomposição da droga parcialmente solubilizada (LAMY-FREUND et al., 1991).

A modificação espectral induzida pela agregação pode ser representada pela razão das absorbâncias A_{348}/A_{409} . Esta razão tem um índice aproximado de 2 nas formas agregadas presentes numa formulação, e um índice aproximadamente de 0,25 no caso das formas monoméricas (BARWICZ et al., 1992).

1.6.2. Espalhamento de luz dinâmico (*light scattering*): solubilização e estabilidade da Anfotericina B.

O espalhamento dinâmico mede flutuações da intensidade da luz espalhada em função do tempo.

A espectroscopia de correlação de fótons (PCS), é uma técnica de espalhamento dinâmico quase-elástico de luz utilizada para caracterizar partículas coloidais — tamanhos na faixa de 1,0 nm a 1,0 μm — a partir da distribuição da frequência da luz espalhada. O instrumento utilizado na técnica de espalhamento de luz dinâmico é composto de: uma fonte de luz (feixe de laser); o espectrômetro, que contém um sistema óptico para definir o ângulo de espalhamento; um detector, geralmente uma fotomultiplicadora; um analisador de sinal que pode ser tanto um analisador de espectro (a tempo real obtém o espectro de um sinal usando técnicas digitais) como um correlator (instrumento capaz de obter a função de correlação de um sinal elétrico); e um computador, utilizado para extrair-se informação do espectro, ou da função de correlação obtida a partir do analisador de sinal.

Em termos gerais, a radiação laser em partículas coloidais em movimento Browniano produz flutuações desordenadas no sinal de intensidade de luz espalhada, com um procedimento temporal dependente do tamanho e forma da partícula. A dependência temporal das flutuações pode ser determinada por autocorrelação do sinal de intensidade espalhada. Para partículas esféricas, a função de autocorrelação decai exponencialmente com uma constante de decaimento Γ proporcional ao coeficiente Browniano médio de difusão, D_0 , das partículas, que por sua vez está relacionado com o seu tamanho (raio hidrodinâmico). No limite de baixa concentração de partículas, interações hidrodinâmicas podem ser desprezadas, e o diâmetro médio da partícula, d , pode ser calculado, usando a equação de Stokes- Einstein (HANUS; PLOEHN, 1999):

$$D_0 = k_b T / 3 \pi \eta(t) d \quad \text{equação 3}$$

Para uma dispersão de partículas esféricas, com viscosidade $\eta(t)$ (em centésimos de poise), sob temperatura constante T (em $^\circ\text{K}$), o coeficiente de difusão D_0 é inversamente proporcional ao diâmetro hidrodinâmico d das partículas, onde k_b é a constante de Boltzmann (1.38054×10^{-16} ergs/deg).

As partículas, fontes secundárias de luz espalhada, estão em movimento Browniano, assim a distância percorrida pelas ondas espalhadas até o detector varia com

o tempo. As ondas eletromagnéticas podem interferir construtivamente ou destrutivamente, dependendo da distância ao detector.

O tempo de decaimento das flutuações está relacionado com a constante de difusão, D_0 , das partículas, que por sua vez depende do raio hidrodinâmico. As partículas pequenas com coeficiente de difusão maior produzem flutuações com decaimentos mais rápidos que as partículas maiores que se movem mais devagar.

No espalhamento quase-elástico de luz, o tempo de decaimento dessas flutuações é medido, usando um correlator, cuja função de autocorrelação é formada pela média dos produtos das intensidades espalhadas medidas em pequenos intervalos de tempo (*delay time*), comparados com o tempo necessário para a flutuação voltar (decair) ao valor médio de intensidade espalhada. Quando t aumenta a correlação é perdida, e a função aproxima-se de um valor médio B . Para tempos pequenos a correlação é alta.

Para uma suspensão monodispersa de partículas esféricas, globulares, rígidas, a função de autocorrelação é dada por:

$$C(t) = A e^{-\Gamma t} + B \quad \text{equação 4}$$

Onde A é uma constante ótica, determinada pelo aparelho e Γ é relacionada ao tempo de relaxação das flutuações por:

$$\Gamma = D_0 q^2 \quad \text{equação 5}$$

Com D_0 = coeficiente de difusão das partículas; q vetor de onda da luz espalhada, dado por:

$$|q| = 4 \pi n / \lambda_0 n \sin\theta/2 \quad \text{equação 6}$$

A partir de medidas da função de autocorrelação, determina-se Γ através do ajuste da função à $C(t)$. Com isso, calcula-se o coeficiente de difusão, D_0 , a partir de λ_0 , n e θ dados.

Finalmente, obtém-se o diâmetro da partícula, usando a relação de Stokes-Einstein (equação 3).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

1.6.3. Atividade *in vitro* e *in vivo* da Anfotericina B

Os testes de sensibilidade antifúngica, *in vitro*, podem predizer a sensibilidade ou resistência, *in vivo*, de um fungo, a um determinado agente antimicótico estudado,

controlando a terapêutica — rol assistencial —, informando a emergência de índices de resistência — rol epidemiológico —, e contribuindo na pesquisa de novas drogas alternativas para o tratamento das micoses.

Os métodos utilizados na execução são adaptações daqueles tradicionalmente empregados pela NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards) para estudos de sensibilidade antibacteriana, como a diluição em caldo ou ágar. Porém, a aplicação destes testes na micologia tem levado em consideração as características físico-químicas dos agentes estudados, relacionadas à insolubilidade, fotossensibilidade e termo-sensibilidade (NCCLS, 1997).

Os resultados dos testes de sensibilidade, baseados em técnicas de diluição, podem ser expressos em valores qualitativos — considerando o fungo como sensível ou resistente — ou quantitativos, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento do microrganismo (tabela 2). Alternativamente, desde que sejam realizados procedimentos complementares ao teste de CIM, estes valores podem ser expressos em termos de concentração fungicida mínima (CFM), considerada como a menor concentração da droga capaz de matar o fungo. A avaliação da CFM é de extrema importância para os casos que envolvem fungos isolados de pacientes imunocomprometidos, assim como pacientes que apresentam micoses graves e ou generalizadas.

A CFM é obtida pelo subcultivo do fungo num meio isento de drogas, a partir dos inóculos que no teste de CIM, realizado por diluição, não apresentaram crescimento visível.

Atualmente a AnB é o único agente que possui atividade fungicida empregado na terapêutica das infecções micóticas.

Tabela 2. *Break point* interpretativo da CIM da Anfotericina B para *C. albicans* (NCCLS, 1997).

Agente antifúngico	<i>Break point</i> CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Sensível	Resistente
Anfotericina B	≤ 1	≥ 2

Embora haja atividade *in vitro*, o comportamento de um antimicrobiano nessa situação é totalmente diferente do seu comportamento *in vivo*. Existem muitos fatores biológicos que devem ser considerados como, por exemplo, a farmacocinética,

farmacodinâmica, ligação a proteínas plasmáticas, e captura pelo sistema mononuclear fagocítico.

Do ponto de vista da terapia é importante lembrar que, no fenômeno da infecção, o antibiótico cumpre um papel complementar ao sistema imune, tanto assim que muitas vezes antibióticos administrados em concentrações subinibitórias, como determinadas por testes *in vitro*, são suficientes para ajudar o sistema imune a acabar com a infecção.

Assim, o êxito de um antibacteriano deve ser aprovado pela sua atividade *in vivo*.

Apesar de controvérsias éticas existentes na comunidade científica, os animais de experimentação são o melhor modelo para avaliar novas terapias. Dentro das recomendações éticas é importante a consideração de trabalhar com o um número baixo de animais sem alterar a estatística (BODEY, G.P,1993).

Para avaliar terapias contra candidíase sistêmica, dos muitos modelos de animais utilizados, o camundongo tem sido claramente o mais popular seguido pelo coelho e o rato (ODDS, F.C., 1988).

Para reproduzir uma candidíase sistêmica inóculos entre $10^3 - 10^8$ UFC/mL podem produzir uma DL_{50} em um período de tempo dependente do tipo de animal utilizado assim como da virulência da cepa estudada (ODDS, F.C., 1988).

1.6.4. Toxicidade *in vitro* e *in vivo* associada ao uso da Anfotericina B

A toxicidade de uma substância química é medida pela sua habilidade em induzir dano a um tecido biológico.

Os estudos de toxicidade são classificados segundo o período no qual um determinado modelo animal é submetido a um esquema terapêutico. Reconhecem-se assim testes de toxicidade agudo, subagudo e crônico (tabela 3). O objetivo dos testes é avaliar se um determinado esquema terapêutico produz efeitos tóxicos como consequência da dosagem usada depois de uma ou de consecutivas administrações da droga, de modo que na prática clínica o terapeuta possa contar com esta informação no momento de iniciar a terapia, avaliando o custo/benefício em alguns casos.

Tabela 3. Definição de toxicidade segundo a IUPAC, 1993 (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

Tipo de estudo	Definição	Testes e observações
Toxicidade Aguda	Efeito adverso ocorrido dentro de um curto período de tempo. Geralmente mede-se o efeito dentro dos 14 dias após a administração de uma simples dose, ou dentro das 24 horas após a exposição a múltiplas doses.	Dose letal média DL ₅₀ , sinais de efeitos farmacodinâmicos (ataxia, fraqueza muscular, salivação), dano no local da administração.
Toxicidade Subaguda (ou subcrônica)	Efeito adverso ocorrido dentro dos 90 dias após da exposição contínua a uma substancia (após múltiplas doses).	Peso corporal, hemograma, coagulação, função hepática e renal, estudos histopatológicos entre outros.
Toxicidade crônica	Efeito adverso observado durante um período prolongado de exposição durante grande parte da vida de um animal, decorrente de uma exposição contínua a uma substancia (exposição crônica).	Peso corporal, hemograma, coagulação, função hepática e renal, estudos histopatológicos entre outros.

Pela sua toxicidade, a utilização de AnB tem sido restrita ao uso hospitalar precisando de monitoramento médico contínuo. O paciente submetido a um tratamento prolongado com uma dose superior a 1,0 mg/kg/dia pode ter a função renal comprometida. A nefrotoxicidade tem sido o principal sintoma descrito durante esquemas terapêuticos prolongados com a AnB. Níveis elevados de creatinina e uréia no sangue de pacientes submetidos à terapia definem a disfunção renal, muitas vezes irreversível. Alguns autores consideram esta disfunção como o aumento em 100% sobre o nível basal de creatinina — duplo aumento — (GALLIS et al., 1990; WINGARD et al., 2000; WINSTON & SCHILLER, 2000). Assim, durante a terapia recomenda-se a constante avaliação dos níveis séricos de creatinina e/ou uréia.

A nefrotoxicidade, associada ao uso endovenoso da droga, apresenta-se como um dano glomerular e tubular que melhora com o cessar da terapia, porém, a cronicidade se manifesta por um acúmulo da droga — acima de 5g — geralmente após a infusão contínua de doses elevadas.

Embora a nefrotoxicidade seja o principal evento, outros efeitos adversos associados à administração de AnB relatam: vômitos, calafrios, febre, dor muscular e óssea, mal-estar geral, anorexia, diarreia, cãibra gastrointestinal, hipertensão, hipotensão,

arritmias cardíacas (fibrilação ventricular), parada cardíaca, "rashes" cutâneos, visão desfocada, perda de audição, vertigem, desordem hepática, neuropatias periféricas e convulsão. Na maior parte dos pacientes desenvolve-se uma anemia normocítica normocrômica reversível, possivelmente pelo efeito supressivo sobre a produção de eritropoietina.

A lesão no sítio da infusão, pela irritação do endotélio venoso, se manifesta com dores e estabelecimento de tromboflebite (inflamação da veia com edema, coagulação local e formação de trombo). Adicionalmente, o extravasamento pode causar um dano tissular.

Para evitar o dano associado à administração endovenosa deve ser realizada uma administração lenta por períodos prolongados de tempo — aproximadamente 6 horas — usando concentrações diluídas da droga — 0,1 mg/mL — em solução isotônica de glicose 5%. A dosagem é individualizada segundo a tolerância de cada paciente, geralmente inicia-se a terapia com uma dose diária de 0,25 mg/kg. Para a AnB convencional, a dose diária não deve exceder 1,5 mg/kg. A duração da terapia depende do grau da infecção. Para micoses graves geralmente um período de 6 – 12 semanas é adequado para atingir a efetividade e reversão do quadro clínico (GALLIS, 1990; MARTINDALE, 1996).

In vitro, a citotoxicidade dos antifúngicos poliênicos pode ser avaliada, em diversas linhagens de células eucarióticas, através de ensaios que determinam a IC₅₀, equivalente à concentração da droga que mata o 50% da população celular mantida em cultura com meios enriquecidos como o RPMI ou o *minimum essential medium* (MEM). Nestes ensaios, avalia-se a atividade da cadeia de transporte de elétron, ou simplesmente a captura de corantes que absorvem a uma determinada longitude de onda. Em ambos casos, a leitura da absorbância em função da concentração da droga, será proporcional à citotoxicidade. Um outro ensaio bastante utilizado, determina o extravasamento dos conteúdos celulares associados à morte celular. Geralmente estes métodos avaliam a citotoxicidade através da quantificação da hemoglobina (espectro de absorção UV-visível = 540 nm) ou do K⁺ intracelular liberado pelas hemácias tratadas com diferentes concentrações de droga, por espectrofotometria ou fotometria de chama, respectivamente.

Embora o antifúngico avaliado apresente toxicidade *in vitro*, *in vivo* este efeito pode ser atenuado pela interação da droga com proteínas plasmáticas ou lipoproteínas que favorecem a solubilização (ARAMWIT et al., 2000). Especificamente, a AnB apresenta uma alta afinidade por lipoproteínas que contém colesterol na sua estrutura (BRAJTBURG et al., 1984; BARWICZ et al., 2002). Dependendo do tipo de lipoproteína, a ligação da AnB pode ser favorável ou desfavorável. JOANNA BRAJTBURG e colaboradores têm observado uma maior toxicidade da AnB quando é associada às LDLs (lipoproteínas de baixa densidade), onde 4 - 10 moléculas de colesterol associam-se a uma molécula de AnB (BRAJTBURG et al., 1984). Em contrapartida, há uma menor toxicidade quando a AnB é transportada pelas HDLs (lipoproteínas de alta densidade).

In vivo, a toxicidade da AnB pode ser avaliada pela quantificação de marcadores enzimáticos que determinam uma função bioquímica específica — principalmente marcadores da função renal com a dosagem de uréia e creatinina — e pelo hemograma (exame laboratorial para a avaliação quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue). Quando o hemograma denota alterações no sangue periférico, complementarmente podem ser realizados testes adicionais que determinem a etiologia do processo estimulatório ou supressor, como por exemplo, o mielograma e esplenograma, os quais avaliam quantitativa e qualitativamente os elementos figurados da medula óssea e do baço, respectivamente.

Adicionalmente em modelos animais pode ser utilizado o estudo histopatológico dos principais órgãos afetados pela toxicidade da droga.

No estudo histopatológico, as alterações morfológicas produzidas por um dano celular não letal são chamadas de “degenerações”. Utilizando-se a microscopia como ferramenta diagnóstica, dois padrões morfológicos podem ser reconhecidos: dilatação celular (inchaço); e degeneração gordurosa. A dilatação celular aparece sempre que as células são incapazes de manter uma homeostase de íons e líquidos, enquanto a degeneração gordurosa se manifesta pela aparição citoplasmática de vacúolos lipídicos, pequenos ou grandes, durante a hipóxia ou em outras várias formas de dano tóxico, principalmente em células envoltas ou dependentes do metabolismo lipídico como hepatócitos e células do miocárdio. No fígado a degeneração gordurosa pode ser uma manifestação de desarranjo metabólico, como uma forma de acúmulo intracelular (ROBBINS et al., 1994).

Morfologicamente a dilatação celular é a primeira manifestação de quase todas as formas de dano celular, difícil de apreciar na microscopia óptica comum, podendo ser mais evidente em nível da totalidade do órgão. Neste caso, aumenta a turgidez (órgão intumesciente, congestionado) e há aumento no peso do órgão. Se há acúmulo de água no interior da célula, há aparecimento de pequenos vacúolos claros no citoplasma. Esses vacúolos representam a distensão do retículo endoplasmático. Este padrão de dano reversível é chamado de “degeneração hidrópica” ou “degeneração vacuolar” (ROBBINS et al., 1994).

Um outro dano conhecido como necrose coagulativa, implica a preservação do contorno básico da célula coagulada por um lapso de alguns dias. Presumivelmente o dano pelo tóxico, ou o subsequente aumento da acidose intracelular, desnatura tanto as proteínas estruturais como também as proteínas enzimáticas, bloqueando assim a proteólise da célula (ROBBINS et al., 1994).

A congestão é o acúmulo de sangue dentro do leito vascular. Esse acúmulo de sangue pode ser arterial — se houver inflamação — ou venosa, se houver estase (problemas no retorno do fluxo venoso circulatório). Tanto na congestão arterial ou venosa haverá lesão celular, porém, a lesão celular por hipóxia, ou congestão venosa, é mais acentuada, com células em diversos estágios de degeneração ou necrose. Se houver células inflamatórias junto com congestão, a etiologia da alteração é inflamatória, caso contrário, se não houver células inflamatórias havendo apenas congestão, a causa será circulatória, como por exemplo, nas insuficiências cardíacas do lado direito, compressões externas ou internas do vaso, entre outras. Qualquer tipo de congestão levará a um quadro de hipóxia e conseqüente degeneração ou necrose.

A inflamação é a reação do organismo à invasão por um agente infeccioso, por desafio com um antígeno ou mesmo apenas por uma lesão física. No processo inflamatório há migração de leucócitos dos capilares, para os tecidos circundantes. Na fase inicial da inflamação os neutrófilos são particularmente prevalentes. No entanto, tardiamente no processo, os monócitos e os linfócitos também migram para o local inflamado. Paralelamente, além do aumento na migração celular, há um aumento do suprimento sanguíneo para as áreas afetadas, e um aumento da permeabilidade capilar.

Quando a resposta imune mediada por células não consegue eliminar rapidamente um organismo infectante, ou quando o material antigênico é resistente a degradação ou é um derivado de componentes próprios do organismo, pode haver acúmulo de células T e liberação de citocinas, formando-se o granuloma. Os

granulomas são característicos de infecções por patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, ou organismos que são grandes e persistentes, como no caso de fungos como *C. albicans*. Caracteristicamente os granulomas são constituídos de células macrofágicas, incluindo células epitelióides e células gigantes multinucleadas. A morfologia destas células sugere que o processo seja o resultado da estimulação crônica dos macrófagos pelas citocinas.

Em ocasiões o processo inflamatório pode localizar-se e condensar-se principalmente ao redor dos vasos sanguíneos, alteração comumente conhecida na histopatologia como manguito. As células inflamatórias do manguito normalmente são polimorfonucleares, o que sugere uma resposta inflamatória aguda. Este tipo de lesão é comum no sistema nervoso, não obstante, pode ocorrer em qualquer outro órgão vascularizado.

No processo inflamatório a fibrose é um evento final, onde há deposição de colágeno. A presença de fibrose indica que houve necrose e /ou inflamação, e que o tecido afetado esta sendo substituído por cicatriz ou fibrose.

Finalmente, na avaliação hematológica devemos considerar a existência e função fisiológica das diferentes linhagens celulares existentes.

Estas células podem ser divididas em eritróides (hemácias), mielóides e linfóides (leucócitos) (figura 6).

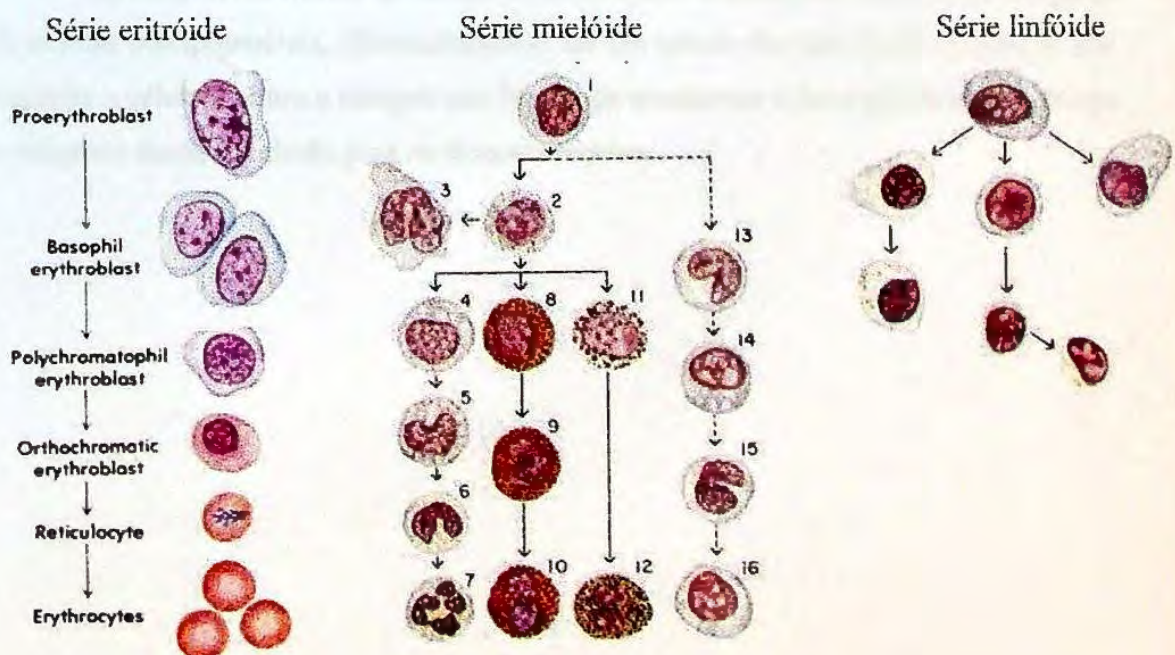


Figura 6. Diferenciação celular na medula óssea das linhagens celulares: eritróide, mielóide, e linfóide. As diferentes células da série mielóide são: 1, mieloblasto; 2, promielócito; 3, megacariócito; 4, mielócito neutrófilo; 5, metamielócito neutrófilo jovem; 6, neutrófilo metamielócito bastonete; 7, polimorfonuclear neutrófilo; 8, mielócito eosinófilo; 9, metamielócito eosinófilo; 10, polimorfonuclear eosinófilo; 11, mielócito basófilo; 12, polimorfonuclear basófilo; 13 – 16, etapas da diferenciação do monócito.

Os leucócitos são as unidades móveis protetoras do sistema, sendo formados parcialmente na medula óssea (granulócitos, monócitos, e uns poucos linfócitos), e parcialmente no tecido linfóide (linfócitos e células plasmáticas). A principal função dos leucócitos é a migração celular específica para áreas de inflamação (buscar e destruir), gerando uma rápida e potente defesa contra agentes infecciosos ou corpos estranhos.

Numa condição normal há uma distribuição equilibrada, gerando-se um desequilíbrio quando há uma alteração fisiológica produzida por fatores endógenos ou exógenos como infecções, alergias, e doenças autoimunes.

Os granulócitos e monócitos são formados unicamente na medula óssea e os linfócitos e células plasmáticas são produzidos em vários órgãos linfóides (glândulas linfáticas, baço, timo, medula óssea).

Os leucócitos formados na medula, especialmente os granulócitos, são armazenados até serem requeridos pelo sistema circulatório, liberando-se depois da chegada de estímulos específicos provenientes do local lesado.

De uma forma similar as células eritróides são formadas na medula óssea a partir de células pluripotenciais, diferenciando-se até um estado de maturação (figura 6) que capacita a célula madura a cumprir sua função de transportar a hemoglobina que carrega o oxigênio desde o pulmão para os diversos tecidos.

2. *Justificativa*

A necessidade de estudar alternativas terapêuticas menos onerosas que as formulações de lipídeos naturais já disponíveis no mercado, e a promissora versatilidade do Brometo de Dioctadecildimetilamônio (DODAB) em solubilizar antifúngicos hidrofóbicos altamente insolúveis, nos inspirou a avaliar a atividade *in vivo* de uma precoce formulação de anfotericina B solubilizada em nanofragmentos de bicamada — formulação DOD/AnB — usando um modelo murino de candidíase sistêmica, utilizando-se como parâmetro comparativo o padrão comercial Fungizon® (DOC/AnB).

3. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo:

- ✓ Caracterizar fisicoquimicamente a solubilização da Anfotericina B incorporada em nanofragmentos de bicamada de DODAB, monitorando a estabilidade da preparação em função do tempo e temperatura.

- ✓ Avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* da Anfotericina B solubilizada em nanofragmentos de bicamada de DODAB.

- ✓ Avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* da Anfotericina B solubilizada em nanofragmentos de bicamada de DODAB.

4. Material e Métodos

Para desenvolver os objetivos deste estudo, as atividades foram divididas em três etapas. Inicialmente efetuou-se a caracterização físico-química da formulação DOD/AnB, e nas etapas subseqüentes realizou-se a determinação da atividade *in vitro* e *in vivo* seguida da avaliação da toxicidade *in vitro*, e *in vivo*: aguda, subaguda, e crônica, no modelo *Swiss webster*. Para fins comparativos, durante todo o estudo utilizou-se o padrão comercial de AnB solubilizada em desoxicolato de sódio (Fungizon® ou DOC/AnB).

4.1. Materiais empregados no experimento

- ✓ Anfotericina B 86,04% de potência (lote 0008000336 SQUIBB, Bristol Meyers)
- ✓ Brometo de dioctadecildimetilamônio "DODAB" (SIGMA)
- ✓ DMSO:Metanol (1:1)
- ✓ Sonicador *cell disrupter virsonic model 150*
- ✓ Espectrofotômetro Hitachi U-200
- ✓ Aparelho *Zeta Sizer* (Brookhave Instrument Corp, Holtsville, NY)
- ✓ *Candida albicans* ATCC (*American Type Culture Collection*) 90028 e HU (Hospital Universitário) 168 (coleção de cepas do Instituto Adolfo Lutz, IAL 2151)
- ✓ Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)
- ✓ Estufa para cultura aeróbia (Fanem)
- ✓ Centrífuga refrigerada *Sorvall* modelo RCL-B Rotor SS-34
- ✓ Água bidestilada qualidade Milli-Q
- ✓ Filtros Millipore 0,45 µm
- ✓ Fungizon® (DOC/AnB, SQUIBB, Bristol Meyers)
- ✓ Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster (outbred)*, com 25 a 35 gramas de peso corporal (Biotério IQ/FCF-USP)

- ✓ Solução salina estéril
- ✓ Solução isotônica de glicose 5%, estéril
- ✓ Seringas de insulina
- ✓ Meio McCoy 5'A (Sigma® Chemical Company, USA)
- ✓ Soro fetal bovino (Cultilab do Brasil®)
- ✓ Heparina 50U (Liquemine®, Roche do Brasil)
- ✓ EDTA (1,5 mg/mL)
- ✓ Hemocitômetro de Neubauer
- ✓ Líquido de Türk (solução de 1% de ácido acético glacial)
- ✓ Citocentrífuga (Incibrás®)
- ✓ Placa de Petri de plástico de 60 mm (Corning® Glass Works, USA)
- ✓ Tubo cônico plástico falco de 15 mL
- ✓ Tubos microhematócrito
- ✓ Formol tamponado
- ✓ Microplacas de ELISA para cultura celular
- ✓ Buffer fosfato salino (PBS, pH 7,0)
- ✓ Vermelho neutro
- ✓ Linhagem celular de epitélio renal de rim de macaco (Monkey, African Green, *cercopithecus aethiops*), obtida da coleção de culturas da Fundação Instituto Osvaldo Cruz, FIOCRUZ, cultura n° CRO15)
- ✓ Meio para cultura de células, MEM (*minimum essential medium*)
- ✓ Estufa para cultura celular (5% CO₂)
- ✓ Leitor de ELISA equipado com filtro de leitura de 540 nm (BioRad)
- ✓ Triton X-100
- ✓ Solução salina estéril
- ✓ Solução isotônica de glicose 5% (0.264 M)
- ✓ Seringas de insulina
- ✓ Tubos *eppendorf*
- ✓ Meio McCoy 5'A (Sigma® Chemical Company, USA)
- ✓ Soro bovino fetal (Cultilab do Brasil®)
- ✓ Heparina 50U (Liquemine®, Roche do Brasil)
- ✓ EDTA (1,5 mg/mL)

- ✓ Hemocítômetro de Neubauer
- ✓ Líquido de Türk (solução de 1% de ácido acético glacial)
- ✓ Citocentrífuga (Incibrás®)
- ✓ Placa de Petri de plástico de 60 mm (Corning® Glass Works, USA)
- ✓ Tubo cônico plástico falco de 15 mL
- ✓ Pipeta Pasteur
- ✓ Tubos microhematócrito
- ✓ Formol tamponado
- ✓ Fosfatase Alcalina (Sera-Pak® Fosfatase Alcalina Bayer®)
- ✓ Transaminase Oxalacética, AST - GOT (BioSystems®)
- ✓ Transaminase Pirúvica ALT-GPT (BioSystems®)
- ✓ Uréia (DyaSys Diagnostic system)
- ✓ Creatinina (Método LUSTGARTEN e WENK)
- ✓ Ferro (RAICHEM®)
- ✓ Analisador bioquímico automatizado (MAS modelo Liasys®, Itália)

4.2. *Caracterização físico-química*

Na tentativa de solubilizar a AnB em ausência de qualquer tipo de solvente tóxico, diferentes concentrações de droga e de fragmentos de bicamada produzidos como descrito anteriormente (VIERA & CARMONA-RIBEIRO, 2001), foram misturados e centrifugados a 10.000 r.p.m. para descartar a presença de qualquer tipo de sedimento. A seguir, na melhor proporção droga:anfifílico macroscopicamente livre de vestígios de droga insolúvel, analisou-se o estado de solubilização da AnB através de uma varredura espectrofotométrica num espectro de longitude de onda UV-visível de 280 - 450 nm, e a partir da distribuição de tamanhos na dispersão, determinada por espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering*).

4.2.1. Preparação dos nanofragmentos de bicamada de DODAB

O DODAB foi pesado para o preparo de uma solução final de 10 mg/mL em água Milli-Q. Nanofragmentos foram preparados por sonicação direta com tip entre 60 – 80 Watts durante 15 minutos. A dispersão obtida foi centrifugada durante 30 minutos a 10°C x 10.000 r.p.m. para precipitar o titânio. Deste modo obteve-se fragmentos com um diâmetro médio aproximado de 86 nm, como determinado por espalhamento de luz dinâmico (CARMONA-RIBEIRO & MIDMORE, 1992).

Para determinar a concentração de DODAB na dispersão, utilizou-se a técnica de microtitulação.

4.2.2. Microtitulação e determinação da concentração de DODAB

Foram separadas três amostras contendo 100 µL de DODAB cada. A seguir, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foi adicionado etanol absoluto numa quantidade suficiente para solubilizar totalmente o DODAB (suspensão sem turvação). Do mesmo modo, foram adicionadas 3 – 4 gotas do indicador 1,5 difenil carbazona obtendo-se uma coloração alaranjada. A titulação foi realizada com uma solução de Hg(NO₃)₂ 10 mM, titulando o DODAB gota a gota até o ponto de viragem, de coloração lilás (SCHALES, O. E. SCHALES, S.S., 1941). Foi calculada a média dos três valores obtidos e aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de DODAB} = \frac{2 \times C \text{ Hg(NO}_3)_2 \times V \text{ Hg(NO}_3)_2}{V_{\text{DODAB}}}$$

C = concentração (M)

V = Volume (L)

4.2.3. Preparação das soluções estoque

Tabela 4. Solventes utilizados para a preparação de soluções estoque de Anfotericina B

Agente	Solvente	Solução Estoque (mg/mL)
Anfotericina B	DMSO:Metanol (1:1)	1,0
Anfotericina B	DMSO:Metanol (1:1)	0,5
Anfotericina B (DOC/AnB)	Água Milli-Q	5,0
Anfotericina B*	DODAB 10 mg/mL*	0,05*
DODAB	Água Milli-Q	10,0

* Formulação DOD/AnB

4.2.4. Incorporação da AnB nas dispersões de DODAB 10 mg/mL

A partir das dispersões de DODAB 10 mg/mL preparadas por sonicação, preparou-se diferentes concentrações de AnB (0,05 – 1,0 mg/mL), num volume final de 8 mL de DODAB 10 mg/mL. Como controle, utilizou-se as mesmas concentrações de AnB em água Milli-Q, 1,0 mg de AnB/mL de DMSO:Metanol (1:1), e 1,0 mg de DOC/AnB por mL de água Milli-Q.

Em tubos de 10 mL de capacidade foram adicionados 8 mL de DODAB 10mg/mL e, a AnB nas seguintes quantidades:

Tubo	DODAB 10 mg/mL (mL)	Anfotericina B (mg)	Concentração final de AnB em DODAB 10 mg/mL (mg/mL)
1	8	0,4	0,05
2	8	0,8	0,1
3	8	3,2	0,4
4	8	4,8	0,6
5	8	6,4	0,8
6	8	8	1,0

4.2.5. Espectros de absorção da AnB solubilizada em nanofragmentos de bicamada de DODAB 10 mg/mL, DMSO:Metanol (1:1), e água Milli-Q

Prévia à administração parenteral, a caracterização físico-química das formulações avaliadas foi feita por espectrofotometria óptica UV-visível obtida no modo duplo feixe luminoso contra um branco de dispersões lipídicas sem droga, para subtrair luz espalhada pela dispersão lipídica presente na formulação DOD/AnB.

Determinou-se a absorção de luz contra o comprimento de onda de 280-450 nm (cubeta de quartzo de 1 cm, espectrofotômetro Hitachi U-2000), das seguintes soluções:

Solução estoque (μL)	DMSO:Metanol (1:1) (μL)	Água Milli-Q (μL)	DODAB 10 mg/mL (μL)	Concentração de AnB lida na cubeta de quartzo ($\mu\text{g/mL}$)
AnB/DMSO:Metanol (1:1) (0,5 mg/mL)				
14	986	-	-	7
	1000	-	-	Branco
DOD/AnB (AnB 0,05 mg/DODAB 10 mg/mL)				
140	-	860	-	7
140	-	-	860	7
		860	140	Branco
AnB/DMSO:Metanol (1:1) (0,5 mg/mL)				
14	-	986	-	7
	14	986	-	Branco
DOC/AnB (AnB 0,05 mg/mL)				
140	-	860	-	7
	-	1000	-	Branco

4.2.6. Distribuição de tamanho dos complexos DOD/AnB na formulação (estabilidade de DOD/AnB em função do tempo e temperatura)

A distribuição de tamanhos nas formulações estudadas — *mean zeta-average diameter* (*Dz*) — foi determinada usando um analisador *ZetaPlus* (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) equipado com um laser de 570 nm e *dynamic light scattering* (90°C) (GRABOWSKI & MORRISON. 1983). A medição dos tamanhos foi realizada na temperatura ambiente (25°C) e aos 4°C, 1 hora após misturar a AnB e DODAB ou às 24 h, 72 h, 7 dias, e 15 dias depois. Durante este tempo as amostras ficaram protegidas da luz e da poeira.

Numa cubeta de poliestireno de 10 mm e 4,5 mL, foram adicionadas as seguintes proporções de solução estoque e do solvente:

Solução estoque (μL)	DMSO:Metanol (1:1) (μL)	Água Milli-Q (μL)	Concentração de AnB lida na cubeta de poliestireno ($\mu\text{g/mL}$)
AnB-DMSO:Metanol (1:1)			
(1,0 mg/mL)			
75		2425	30
DODAB 10 mg/mL			
1500		1000	—*
DOD/AnB*			
(AnB 0,05-DODAB 10 mg/mL)			
1500		1000	30*
DOC/AnB			
(AnB 0,05 mg/mL)			
1500		1000	30

* Concentração final de DODAB = 6 mg/mL

No aparelho *Zeta Sizer* foi possível medir o tamanho de cada dispersão de AnB. A leitura foi feita de acordo com recomendações do fabricante com o detector coletando entre 1 – 2 Mcps (Mega counts per second)

4.3. Avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo* da formulação DOD/AnB

4.3.1. Avaliação da atividade *in vitro*

- ✓ Realização do teste de sensibilidade antifúngica para leveduras utilizando AnB/DMSO:metanol (1:1), DODAB, DOD/AnB, e DOC/AnB

Determinação da atividade fungicida

Microrganismos

C. albicans HU 168, isolada da hemocultura de um paciente com diagnóstico de endocardite adquirida por infecção hospitalar, foi testada para conhecer sua sensibilidade *in vitro* frente às formulações estudadas. *C. albicans* ATCC 90028 foi utilizada como cepa de referência para o controle de qualidade do teste de sensibilidade antifúngica realizado. As amostras, mantidas em laboratório por período prolongado, foram submetidas a pelo menos três repiques sucessivos de 24 horas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), antes da preparação do inóculo, para assegurar uma fase de crescimento exponencial.

Inóculo

Ambas cepas de *C. albicans* foram semeadas em ASD, a 35°C, por 24 – 48 horas, antes da realização do teste. Posteriormente, a partir de cada cultura foram transferidos 3 – 5 colônias com diâmetro maior que 1 mm, para um tubo com 5 ml de solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%). A suspensão foi homogeneizada no *vortex* por 15 segundos, e ajustada no espectrofotômetro (Espectronic 20, BAUSCH & LOMB), numa longitude de onda de 530 nm, para 80 - 85% de transmitância (turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland — aproximadamente 10⁶ UFC/mL). A confirmação do tamanho do inóculo, em unidades formadoras de colônia (UFC/mL) presentes na suspensão de trabalho, foi feita por contagem em placas de ASD semeadas

a partir de 7 diluições seriadas 1:10. Cada placa foi inundada com 1 mL de cada diluição, homogeneizada com alça de Drigalski, e incubada a 35°C por 48 horas para posterior contagem de UFC/mL.

Agentes estudados e solução estoque

Cada formulação de AnB foi preparada, utilizando-se como solvente o DMSO:metanol (1:1) ou água.

Tabela 5. Solventes utilizados para a preparação de soluções estoque de Anfotericina B

Agente	Solvente	Solução Estoque µg/mL
Anfotericina B	DMSO:Metanol (1:1)	1000
Anfotericina B (DOC/AnB)	Água Milli-Q	5000
Anfotericina B	DODAB, 10 mg/mL	50

Diluições das drogas para realização do teste de sensibilidade**Tabela 6.** Diluição da solução estoque de AnB em DMSO:Metanol (1:1) para realização do teste de sensibilidade *in vitro*.

Solução com (mL)	Diluyente DMSO:Metanol (1:1) (mL)	Concentração intermediária de AnB (µg/mL)	Concentração final de AnB no ensaio 1:100 (µg/mL)
1000 µg/mL			
0,5	0,5	0,5	500
500 µg/mL			
0,8	0,2	400	4
400 µg/mL			
0,2	0,2	200	2
0,25	0,75	100	1
0,125	0,875	50	0,5
50 µg/mL			
0,2	0,2	25	0,25
0,25	0,75	12,5	0,125
0,125	0,875	6,25	0,0625
6,25 µg/mL			
0,2	0,2	3,125	0,03
0,25	0,75	1,5625	0,015

Tabela 7. Diluição da solução estoque de DOC/AnB (AnB 5000 µg/mL) para realização do teste de sensibilidade *in vitro*.

Solução com (mL)	Diluyente Água Milli-Q (mL)	Concentração intermediária de AnB (µg/mL)	Concentração final de AnB no ensaio 1:10 (µg/mL)
AnB 5000 µg/mL			
0,1	9,9	50	5
AnB 50 µg/mL			
0,8	0,2	40	4
AnB 40 µg/mL			
0,2	0,2	20	2
0,25	0,75	10	1
0,125	0,875	5	0,5
AnB 5 µg/mL			
0,2	0,2	2,5	0,25
0,25	0,75	1,25	0,125
0,125	0,875	0,625	0,0625
AnB 0,625 µg/mL			
0,2	0,2	0,3125	0,03
0,25	0,75	0,15625	0,015

Tabela 8. Diluição da solução estoque de DOD/AnB (AnB 50 µg/mL) para realização do teste de sensibilidade *in vitro*.

Solução com (mL)	Diluyente Água Milli-Q (mL)	Concentração intermediária de AnB (µg/mL)	Concentração final de AnB no ensaio 1:10 (µg/mL)
AnB 50 µg/mL			
0,8	0,2	40	4
AnB 40 µg/mL			
0,2	0,2	20	2
0,25	0,75	10	1
0,125	0,875	5	0,5
AnB 5 µg/mL			
0,2	0,2	2,5	0,25
0,25	0,75	1,25	0,125
0,125	0,875	0,625	0,0625
AnB 0,625 µg/mL			
0,2	0,2	0,3125	0,03
0,25	0,75	0,15625	0,015

Diluição do Inóculo

A partir de cada suspensão de *C. albicans*, ajustada na escala 0,5 de McFarland, realizou-se uma diluição 1:100 em água destilada, e em seguida, a 1:20, de modo que a suspensão final conteve cerca de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Sempre que preparada, o número de UFC/mL na suspensão de trabalho foi confirmada por contagem em placa.

Execução do teste CFM

Tanto para a cepa *C. albicans* HU168 como para a cepa de *C. albicans* ATCC, foram preparadas três séries de 10 tubos de vidro (12 x 75 mm) contendo 100 µL de cada uma das diluições seriadas das drogas (tabela 7, 8), e uma outra série de 10 tubos contendo 10 µL da solução estoque de AnB-DMSO:Metanol (tabela 6).

Para cada série, adicionou-se a suspensão de trabalho num volume final de 1 mL.

Para cada cepa incluiu-se um tubo “controle de crescimento”, preparado nas mesmas condições anteriormente descritas, porém substituindo a droga pelo respectivo diluente.

Os tubos foram incubados a 35°C por 48 horas antes de se determinar a CFM. Transcorrido este tempo, o conteúdo de cada tubo foi semeado na superfície de placas de ASD, as quais foram incubadas a 35°C por 48 horas para verificar se houve inibição ou morte do microorganismo.

Leitura e interpretação dos resultados

A menor concentração da droga (µg/mL) que impediu o desenvolvimento do microorganismo (UFC/mL) foi considerada CFM.

Os resultados das CFMs foram interpretadas segundo os critérios de sensibilidade da *C. albicans* a AnB, utilizados pela NCCLS (NCCLS, 1997).

Tabela 9. *Break point* interpretativo da CIM da Anfotericina B para *C. albicans* (NCCLS, 1997).

Agente antifúngico	<i>Break point</i> CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Sensível	Resistente
Anfotericina B	≤ 1	≥ 2

Tabela 10. *Break point* de anfotericina B para a cepa de referência ATCC 90028, recomendada para controle de qualidade (NCCLS, 1997).

Organismo	Antifúngico	Espectro da CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Anfotericina B	0,5 – 2,0

4.3.2. Avaliação da atividade *in vivo*

Uma vez avaliada a solubilização de AnB em dispersões de DODAB, verificando sua atividade fungicida *in vitro* contra espécies de *Candida albicans*, foi proposto um modelo murino de candidíase sistêmica utilizando camundongos *Swiss Webster* fêmeas (CLARK et al., 1991).

Candidíase sistêmica induzida no modelo murino *Swiss Webster*.

- ✓ Análise da sobrevivência
- ✓ Análise da recuperação das leveduras dos órgãos colonizados (baço e rins)
- ✓ Avaliação histopatológica dos rins (Coloração de Hematoxilina & Eosina e Grocott)

4.3.2.1. Análise de Sobrevivência

Microorganismo e condições de cultura

Para este estudo foi utilizada a cepa de *C. albicans* HU168 isolada da hemocultura de um paciente internado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

A cepa foi mantida em água destilada estéril sendo realizados, no mínimo, três repiques antes do preparo do inóculo, assegurando a viabilidade e a fase de crescimento exponencial.

Atualmente a cepa foi depositada na coleção de cepas do Instituto Adolfo Lutz, sendo classificada como *C. albicans* IAL 2151.

Animais

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster*, com 25 a 35 gramas de peso corporal, provenientes do Biotério do IQ/FCF-USP, foram distribuídos em grupos de 5,

de acordo com o tratamento a ser realizado, ficando em condicionamento por um período de 1 semana antes de realizar o estudo.

Os animais foram alimentados com ração fornecida pelo próprio biotério, e água previamente esterilizada. As gaiolas foram higienizadas a cada dois dias.

Formulações de Anfotericina B

Foi utilizada a formulação comercial DOC/AnB sob a forma injetável, adquirida de uma farmácia hospitalar, e a formulação DOD/AnB (0,05 mg de AnB e 10 mg de DODAB por mL de água bidestilada estéril, qualidade Milli-Q).

Preparo do Inóculo e desenvolvimento da infecção

Os animais foram manipulados segundo procedimentos estabelecidos (SIGLIN & RUTLEDGE, 1995; SCHMIDT, 1999). O inóculo utilizado para a indução de candidíase sistêmica foi preparado a partir do cultivo da levedura em ASD, incubado por 18 horas (fase logarítmica) a 37° C. As células foram lavadas três vezes em solução fisiológica estéril mediante centrifugação a 2000 r.p.m. por 5 minutos. A suspensão foi ajustada pela leitura no espectrofotômetro, em 530 nm, para 70 % de transmitância. Esta turvação, equivalente a aproximadamente 5×10^6 células/mL, foi confirmada pela contagem de colônias em placas de ASD.

Os animais foram inoculados com 100 µL da suspensão, por meio de injeção na veia lateral da cauda e monitorado diariamente duas vezes no dia (CLARK et al., 1991).

Administração dos antifúngicos

Tanto as doses de DOC/AnB como da formulação DOD/AnB foram administradas parenteralmente nas mesmas condições, seguindo as recomendações de infusão (GALLIS et al., 1990; MARTINDALE, 1996). Para a administração parenteral, o DOC/AnB foi reconstituído em água bidestilada estéril e diluído em glicose 5%, como recomendado (TRISSEL, 1998).

As formulações contendo 0,05 mg de AnB/mL foram mantidas a 4°C por não mais que uma semana. Após o primeiro dia de infecção, foram diariamente administradas doses de AnB endovenosamente pela veia lateral da cauda ou intraperitonealmente, segundo o seguinte esquema:

$$\text{Vol. da formulação administrada (mL)} = \frac{\text{Peso (Kg)} \times \text{dose (0,2 mg/Kg)}}{\text{Concentração de AnB na formulação (0,05 mg/mL)}}$$

Avaliação do tratamento

Para ambas as formulações, a terapia foi avaliada pelo tempo de sobrevivência até o dia 35 após infecção, pela recuperação de leveduras a partir dos rins e o baço e, pela histopatologia renal.

Análises da sobrevivência

Camundongos *Swiss Webster* separados em grupos de 5, foram inoculados com 100 µL da suspensão 5×10^6 UFC/mL e tratados após 24 horas da infecção, monitorando a sobrevivência segundo o seguinte esquema: Tabela 11.

Tabela 11. Esquema terapêutico utilizado na avaliação da sobrevida de animais submetidos a uma candidíase sistêmica.

	Regime de Tratamento		Via de administração do tratamento ²	Número de doses	Dias de avaliação
	AnB/mg/kg/dia				
	DOD/AnB	DOC/AnB			
Grupo I (n= 10)	0,2	-	IV	4	35
Grupo II (n= 10)	-	0,2	IV	4	35
Grupo III (n= 10)	0,2	-	IP	10	35
Grupo IV (n=10)		0,2	IP	10	35
Grupo V (n=10)	0,4		IP	10	35
Grupo VI (n=10)		0,4	IP	10	35
Controle DODAB sem droga (n=10)*	-	-	IV	4	35
Controle DODAB sem droga (n=10)*	-	-	IP	10	35
Controle positivo (n=10)	-	-	-	-	35
Controle negativo (n=10) ¹	-	-	-	-	35

* veículo da anfotericina, administrado na mesma dosagem que DOD/AnB.

¹ Inoculados com água bidestilada

² i. v. intravenoso; i. p. intraperitoneal

4.3.2.2. Estudo da recuperação das leveduras do baço e rins

Paralelamente ao estudo de sobrevivência, anteriormente descrito, grupos de camundongos *Swiss Webster* foram inoculados com 100 μL da suspensão 5×10^6 UFC/mL e tratados por 4 ou 7 dias consecutivos, sendo sacrificados no 5º ou 8º dia respectivamente, para avaliar a eficiência de ambas formulações na redução da colonização, seguindo o seguinte esquema:

Tabela 12. Esquema terapêutico utilizado no estudo da recuperação das leveduras dos órgãos colonizados

	Regime de Tratamento		Via de administração do tratamento ²	Número de doses	Dia do sacrifício
	AnB/mg/kg/dia				
	DOD/AnB	DOC/AnB			
Grupo I (n= 7)	0,2	-	IV	4	5
Grupo II (n= 7)	-	0,2	IV	4	5
Grupo III (n= 7)	0,4	-	IP	7	8
Grupo IV (n=7)		0,4	IP	7	8
Grupo V (n=7)	4,0		IP	7	8
Grupo VI (n=7)		4,0	IP	7	8
Controle positivo (n=7)	-	-	-	-	8

* veículo da anfotericina, administrado na mesma dosagem que DOD/AnB.

¹ Inoculados com água bidestilada

² i.v, intravenoso; i.p. intraperitoneal

Ao completar o 5º ou 8º dia, os animais foram sacrificados. Os órgãos foram assepticamente retirados e pesados. Cada órgão foi macerado em 1 mL de solução fisiológica estéril (SF) e 100 μL do homogeneizado foi diluído 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} em SF estéril para ser semeado em placas de ASD. Após 48 horas de incubação a 37°C realizou-se a contagem de UFC/mL.

4.3.2.3. Avaliação histopatológica dos rins

Para cada grupo, aleatoriamente, foi escolhido um rim esquerdo e um rim direito, o qual foi conservado em formol tamponado para posterior análise histopatológica, incluindo a coloração com hematoxilina-eosina (H&E) e Grocott, para a visualização do dano renal e elementos fúngicos que pudessem estar presentes (MICHALANY, J., 1981; KRETSCHMAR et al., 1999). As preparações das amostras, assim como a análise histológica foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP com a ajuda do Prof. Dr. José Luiz Guerra.

4.4. Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* da formulação DOD/AnB

4.4.1. Toxicidade *in vitro* contra a linhagem celular epitelial renal: método de captura do vermelho neutro (FINTER, 1969; FORTI, 1986; HANSEN et al., 1989; CIAPETTI et al., 1996).

Preparação das células

Células epiteliais renais, de rim de macaco, foram cultivadas em monocamada (5% CO₂, 37°C), em garrafas contendo 250 mL de *minimum essential medium* (MEM), glutamina 20 mM, soro fetal bovino 10%, penicilina (100 UI/mL), e estreptomicina (100 µg/mL). Posteriormente, células na fase de pré-confluência (após 24 h de cultura) foram colhidas com tripsina, contadas em câmara de Neubauer, e distribuídas em microplacas de 96 poços numa concentração final de aproximadamente 1 x 10⁵ células/mL num volume de 200 µL/poço (FINTER, 1969; FORTI, 1986; HANSEN et al., 1989; CIAPETTI et al., 1996).

Interação célula/antifúngico

Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi aspirado desde a monocamada, lavado duas vezes com PBS, e substituído por 0.2 mL de cada formulação de AnB previamente diluída em solução isotônica de D-glicose estéril 5% (0.264 M, AnB 0.3 – 20 µg/mL), ou DODAB sem AnB. A concentração final do DODAB, independente da incorporação de AnB, foi: 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g/L respectivamente. Um controle positivo (CP) e negativo (CN) da citotoxicidade foi preparado pela incubação da monocamada com 0.1% de Triton X-100 em D-glicose (100% de citotoxicidade) ou D-glicose estéril 5% (100% de viabilidade), respectivamente. Todas as amostras e controles foram testados em triplicata. As microplacas contendo as deferentes misturas foram incubadas por uma hora a 37°C numa atmosfera contendo 5% de CO₂.

Avaliação da citotoxicidade pelo método de captura do vermelho neutro

A viabilidade celular foi determinada por um método colorimétrico no qual a captura de vermelho é proporcional à viabilidade. Assim, após 1 h de interação, os diferentes meios foram aspirados desde as monocamadas, realizando-se duas lavagens com PBS, e substituídos por uma solução do corante vermelho neutro, 67 µg/mL em D-glicose 5% estéril, previamente filtrada através de um filtro Millipore estéril de 0,45 micras. A mistura célula/corante foi incubada adicionalmente por 2 h a 37°C na estufa de cultura celular, e posteriormente foi descartada. As células novamente foram lavadas duas vezes com PBS e finalmente o corante absorvido pelas células foi extraído pela adição de 0.1 mL de etanol 50% (v/v) em ácido acético (1%). As microplacas foram agitadas por rotação durante 10 minutos, e a absorbância (*A*) foi lida num leitor de ELISA numa longitude de onda de 540 nm. (FINTER, 1969; FORTI, 1986; HANSEN et al., 1989; CIAPETTI et al., 1996).

Interpretação dos resultados

Para determinar a porcentagem de viabilidade utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = A_{540} \text{ células tratadas} / A_{540} \text{ células não tratadas (CN)} \times 100$$

Para cada concentração, a porcentagem de citotoxicidade foi obtida pela diferença da %viabilidade encontrada contra um 100%. A %citotoxicidade \pm o desvio padrão foi expresso graficamente determinando-se a IC₅₀ para cada formulação.

4.4.2. Toxicidade in vivo, aguda e crônica, no modelo murino Swiss webster

Camundongos fêmeas *Swiss webster (outbred)*, na faixa de idade adulta (60 – 90 dias), com um peso médio ao redor de 36,34 \pm 4,88 gramas, foram distribuídos em grupos de 10 formando-se dois grupos para cada regime terapêutico. Diariamente, durante 10 dias, administrou-se uma dose intraperitoneal (i.p.) de cada formulação

(tabela 11). A dose utilizada para avaliar os estudos de toxicidade foi aquela dose terapêutica utilizada na análise de sobrevivência, na qual camundongos com candidíase sistêmica tiveram 100% de sobrevivência após tratamento (LINCOPAN et al., 2003).

O estudo de toxicidade foi subdividido numa etapa subaguda (durante a administração), aguda (após 10 dias de tratamento), e crônica (180 dias após tratamento). A avaliação da toxicidade compreendeu:

- ✓ Anamnese
- ✓ Testes bioquímicos (função hepática e renal)
- ✓ Testes hematológicos (hemograma, mielograma e esplenograma)
- ✓ Autópsia e histopatologia (coloração hematoxilina eosina)

Esquema terapêutico

As formulações a serem comparadas foram administradas de forma que todos os animais recebessem uma idêntica dose de AnB, num volume similar. Os grupos controles receberam o veículo (lipídeo sintético “DODAB” sem droga) ou solução salina estéril, no mesmo volume. Durante todo o experimento utilizou-se DOC/AnB como parâmetro comparativo. Cada formulação preparada foi administrada i.p. segundo o seguinte esquema:

Tabela 13. Esquema terapêutico para avaliação da toxicidade.

	Esquema terapêutico		Via de administração do tratamento ²	Número de doses	Dia de realização dos testes ^{3,4}	Período de observação (dias)
	AnB/mg/kg/dia	DOC/AnB				
Grupo I (n=20)	0,4	-	IP	10	11 - 180	180
Grupo II (n=20)	-	0,4	IP	10	11 - 180	180
Controle DODAB sem droga (n=20)*	-	-	IP	10	11 - 180	180
Controle salino (n=20) 1	-	-	IP	10	11 - 180	180

* veículo de lipídeo sem anfotericina, administrado na mesma dosagem que em DOD/AnB.

¹ Inoculados com solução salina estéril

² i.p.: intraperitoneal

³ Avaliação da função hepática, renal, histopatológica e hematológica no 11º dia (toxicidade aguda)

⁴ Avaliação histopatológica e hematológica após sexto mês (toxicidade crônica)

Extração do sangue e autopsia

No décimo primeiro dia após tratamento realizou-se a coleta de sangue sem anticouagulante, da região retroorbital, para a análise bioquímica. Adicionalmente realizou-se a colheita de sangue com EDTA (1,5 mg/mL), por punção venosa, para a análise hematológica.

4.4.2.1. Anamnese

Sinais de reação adversa tais como: ataxia, fraqueza muscular, salivação, dano local, que pudessem ser visíveis nos períodos antes, durante e após a administração de cada formulação.

O peso de cada camundongo foi registrado em cada período do estudo, empregando-se o cálculo de peso médio por grupo na análise comparativa.

4.4.2.2. Testes bioquímicos

A determinação espectrofotométrica automatizada de metabólitos e enzimas, marcadores da função renal e hepática foram realizadas no décimo primeiro dia após tratamento, abrangendo:

1) Dosagem de ferro

2) Função Hepática (enzimas intracelulares e da superfície celular)

- ✓ *Fosfatase Alcalina*
- ✓ *Transaminase Oxalacética (Aspartato aminotransferase AST-GOT)*
- ✓ *Transaminase Pirúvica (Aspartato aminotransferase ALT-GPT)*

3) Função Renal (substratos metabólicos)

- ✓ *Uréia*
- ✓ *Creatinina*

Para determinar os parâmetros bioquímicos foram empregados 4 a 5 *pools* de soros coletados de animais submetidos a cada esquema terapêutico (tabela 11), sendo que as amostras que apresentaram traços de hemólise foram descartadas.

Para realizar todas as determinações bioquímicas, incluindo a dosagem de ferro sérico, utilizou-se 1 mL de cada pool de soro. A determinação automatizada foi realizada num analisador bioquímico automatizado, MAS modelo Liasys®, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.4.2.3. Testes hematológicos

Da mesma forma, no dia 11 e no começo do 7º mês após do término dos tratamentos, amostras de sangue obtidas por punção venosa, medula óssea obtida por punção do fêmur; e a retirada do baço (n=5 por grupo) coletaram-se para a análise do hemograma, mielograma, e esplenograma.

A) Hemograma

Após 10 e 180 dias de administração das diferentes formulações (tabela 11), amostras de sangue obtidas por punção venosa, em camundongos previamente anestesiados com éter etílico, foram misturadas com EDTA (1,5 mg/mL) para efetuar o hemograma, realizado no Laboratório de Hematologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (BORELLI et al., 1995; BORELLI & NARDINELLI, 2001). No hemograma, os seguintes parâmetros foram avaliados:

- ✓ Dosagem de hemoglobina
- ✓ Contagem de eritrócitos
- ✓ Contagem de leucócitos
- ✓ Fórmula leucocitária – contagem diferencial das células do sangue periférico

B) Mielograma

Após da administração das diferentes formulações (tabela 11) foram obtidas células da medula óssea. Os animais foram previamente anestesiados conforme anteriormente descrito, exsanguinados e sacrificados por deslocamento cervical. As células da medula óssea foram obtidas pela lavagem da cavidade femoral com meio McCoy 5'A, complementado com 10% de soro bovino fetal e heparina (50U). A suspensão celular foi colocada em tubos plásticos, cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo Pasteur e mantida em banho de gelo.

As células obtidas da medula óssea foram quantificadas em hemocítmetro de Neubauer, após diluição em líquido de Türk (ácido acético glacial 1%). Utilizando-se uma citocentrífuga foram preparadas lâminas com amostras da suspensão total das células, as quais foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). A contagem diferencial das células coradas foi analisada sob microscopia óptica convencional, efetuando-se a contagem de no mínimo 200 células por lâmina (BORELLI et al., 1995; BORELLI & NARDINELLI, 2001).

C) Esplenograma

Da mesma forma anteriormente descrita, animais previamente anestesiados foram exsanguinados e sacrificados por deslocamento cervical. A seguir, procedeu-se a abertura do animal por meio de secção cutânea estendendo-se da região mentoniana à pubiana, permitindo a visualização dos órgãos cavitários, tanto abdominais como torácicos. O baço foi retirado, pesado e transferido para placa de Petri de plástico de 60 mm, descartável, contendo 10 mL de solução salina gelada sem Ca^{++} e sem Mg^{++} , e EDTA 10%. A cápsula do baço foi dissociada mecanicamente liberando-se o estroma esplênico. A suspensão celular foi homogeneizada, transferida para um tubo cônico plástico de 50 mL, e mantida em banho de gelo por 5 minutos para a sedimentação do estroma celular mais denso. Após a sedimentação, o sobrenadante foi transferido para tubo cônico plástico de 15 mL. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1.000 r.p.m. em centrífuga refrigerada, o sobrenadante desprezado, e as células ressuspensas em 1mL de meio de cultura McCoy's 5A modificado. As alíquotas utilizadas para as contagens em hemocítmetro foram diluídas em líquido de Türk.

Para a avaliação morfológica e contagem diferencial das células esplênicas, foram realizados citocentrifugados, utilizando-se amostras da suspensão celular na concentração de $2,0 \times 10^6/\text{mL}$ (em duplicata), sendo as lâminas posteriormente submetidas às colorações panóticas: May-Grunwald-Giemsa modificado utilizando-se tampão de pH 5,5 (ROSENFELD, 1947). A análise das células foi feita em microscopia convencional, contado-se de 200 - 300 células por lâmina. (BORELLI et al., 1995; BORELLI & NARDINELLI, 2001).

4.4.2.4. Autópsia e avaliação Histopatológica

No dia 11, e após 180 dias de finalizado os tratamentos, animais (n=5) sacrificados por deslocamento cervical foram submetidos à autópsia através da abertura do animal por meio de secção cutânea estendendo-se da região mentoniana à pubiana, permitindo a visualização macroscópica de possíveis danos celulares dos órgãos cavitários, tanto abdominais como torácicos. O baço, fígado, rins, e cérebro foram assepticamente retirados e conservados em formol tamponado (pH 7,0) para a visualização microscópica dos possíveis danos celulares, por histopatologia (coloração hematoxilina-eosina). A preparação das amostras, assim como a análise histológica foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP com a ajuda do Dr. Guilherme Durante Cruz.

4.5. *Análise Estatística*

Diferenças na sobrevivência após os 35 dias de observação foram avaliadas por Kaplan-Meier seguido do Wilcoxon test. A comparação das contagens das colônias de *C. albicans* recuperadas desde os rins e baço dos animais tratados foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis. As diferenças nos parâmetros de toxicidade estudada foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, a ANOVA, e o Dunn's Multiple Comparison Test. Adotou-se $P < 0,05$ como estatisticamente significativa. As análises estatísticas, tabelas, e gráficos, foram realizadas com o auxílio dos softwares: STATISTICA for Windows (STATSOFT, INC., Tulsa, USA); MINITABTM Statistical Software for Windows (MINITAB INC); GraphPad® Prism (GraphPad Software, Inc); e o software Origin 6.1 (OriginLab Corporation). O cálculo da IC₅₀ na citotoxicidade foi realizado no software Origin 6.1.

5. Resultados

5.1. Etapa I: Caracterização físico-química da formulação DOD/AnB

5.1.1. Incorporação da Anfotericina B nas dispersões de DODAB:

10 mg de fragmentos de bicamada solubilizaram uma concentração de anfotericina B $\leq 0,1$ mg, na ausência de solvente orgânico.

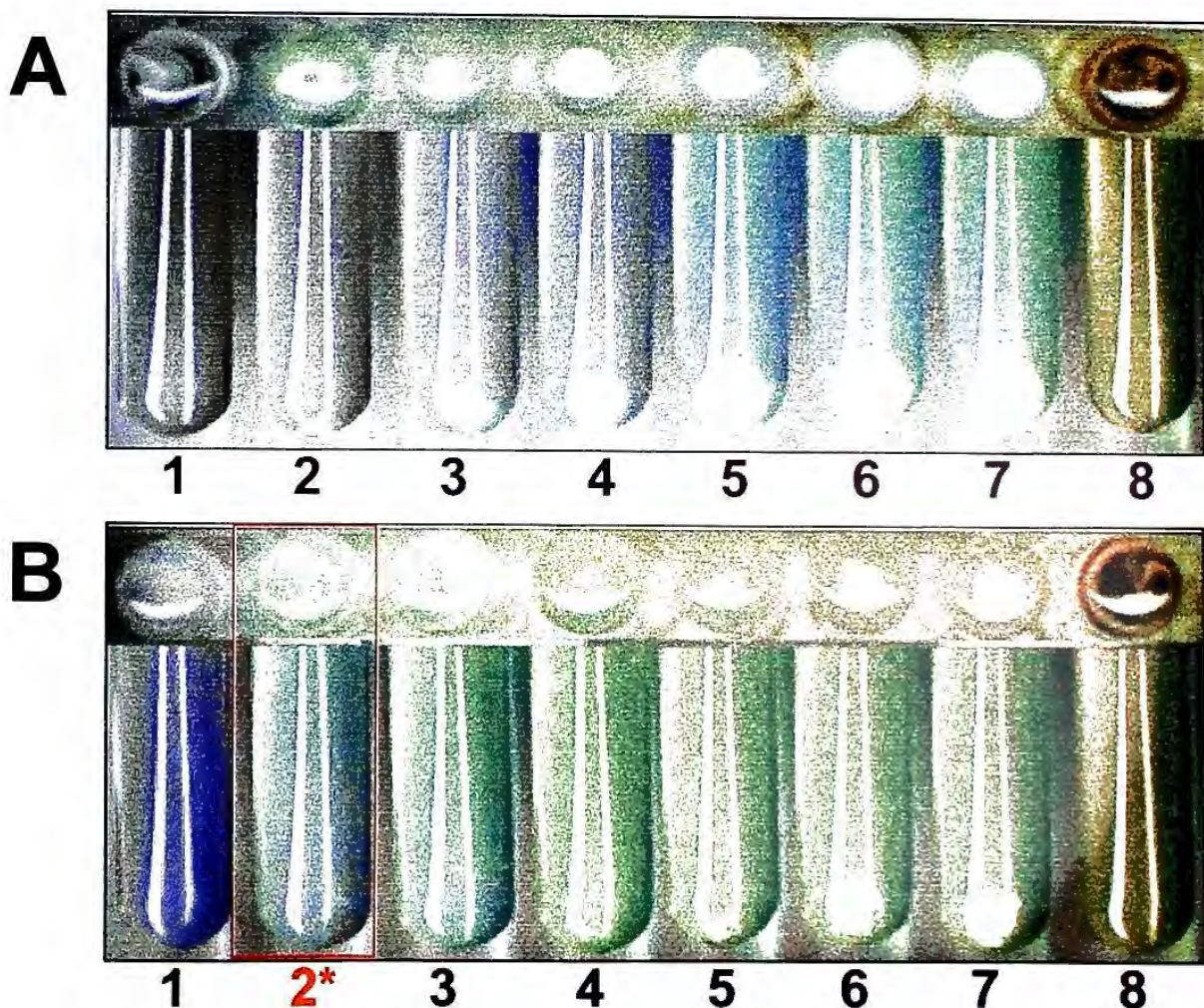


Figura 7. (A) AnB solubilizada em água: tubo 1, água sem droga; tubos 2 – 7: 0.05 - 0.1 - 0.4 - 0.6 - 0.8 mg AnB/mL. (B) AnB solubilizada em nanofragmentos de bicamada de DODAB 10 mg/mL: tubo 1, DODAB sem droga; tubos 2 – 7: 0.05 - 0.1 - 0.4 - 0.6 - 0.8 mg AnB/mL. (A e B) tubo 8, AnB 1mg/mL solubilizada em DMSO:Metanol 1:1.

* Formulação DOD/AnB (AnB 0.05 mg solubilizada em 10 mg/mL de DODAB)

5.1.2. Representação gráfica da solubilização da Anfotericina B em nanofragmentos de bicamada de DODAB, monitorada por espectrofotometria UV-visível:

Predomínio de formas monoméricas na formulação DOD/AnB. Espectro de absorção UV-visível idêntico ao da AnB solubilizada na mistura dos solventes, DMSO:Metanol (1:1), com o pico máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) ao redor dos 411 nm.

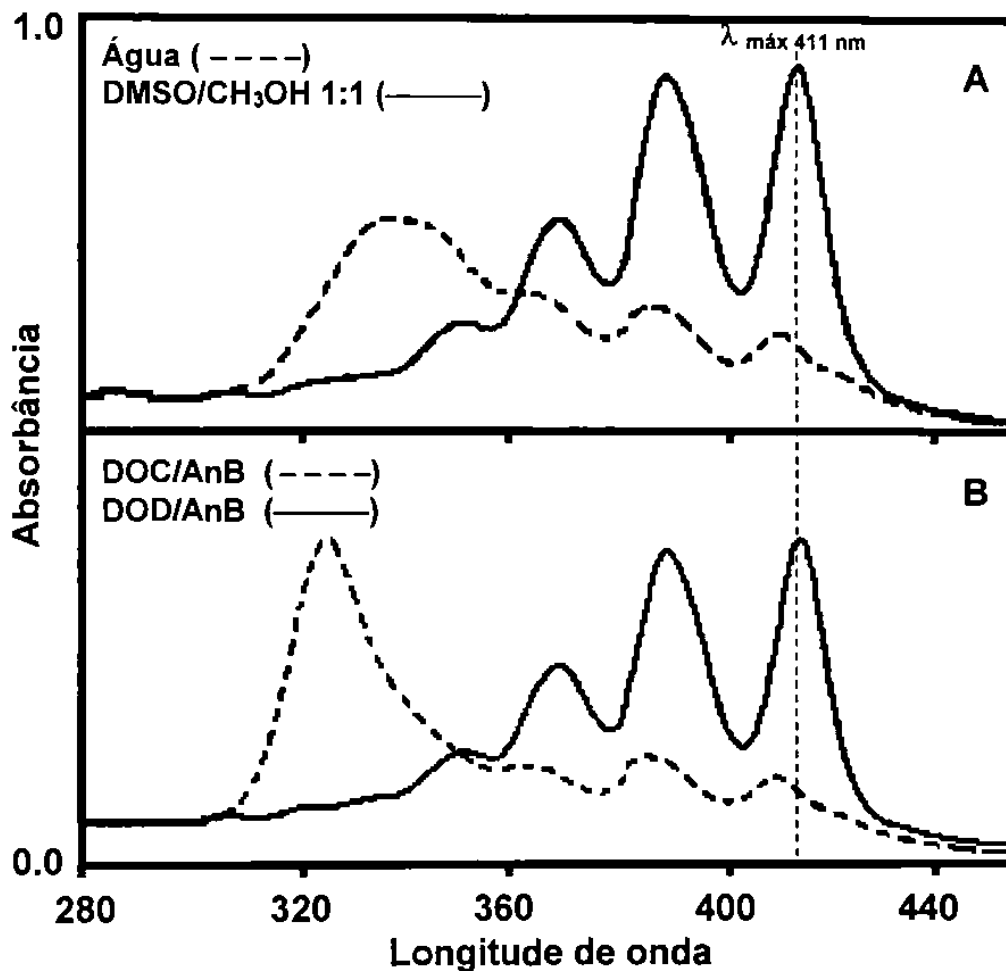
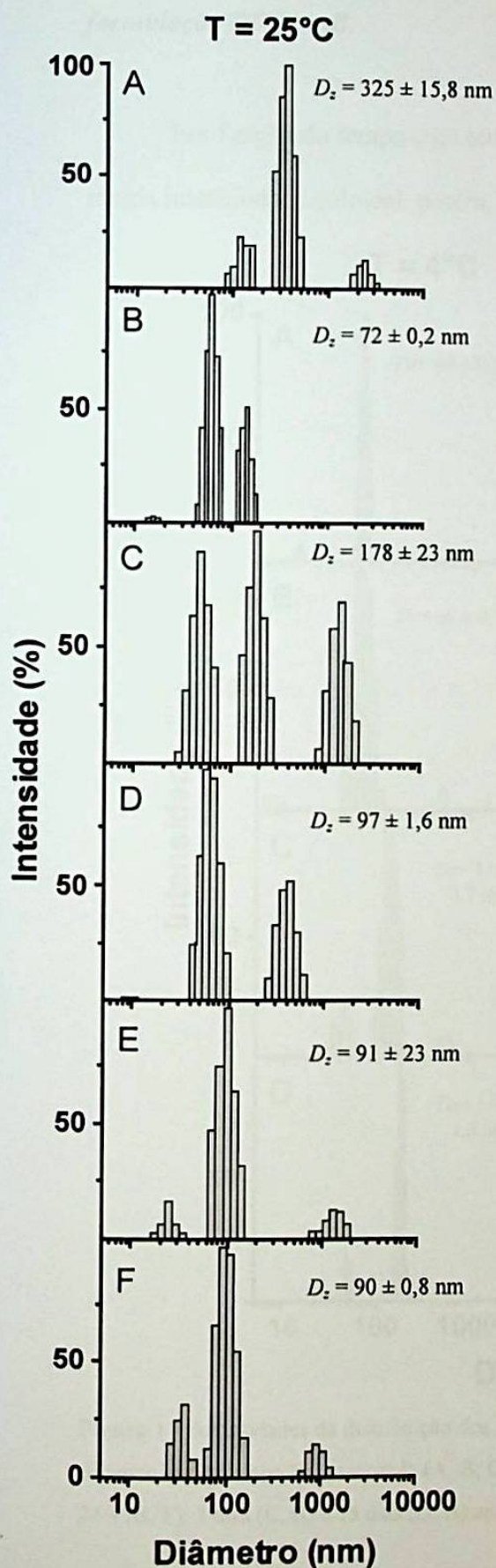


Figura 8. Espectros de absorção UV-visível de AnB monomérica (—) e agregada (---). O solvente é (A) DMSO:metanol 1:1 (—) ou água (---); (B) formulação DOD/AnB solubilizada em água (—), e Fungizon® (DOC/AnB) reconstituído como recomendado para sua administração (---). Ambas soluções correspondem as diluições das formulações injetadas no modelo animal. A concentração final de AnB e DODAB no experimento foi 7 $\mu\text{g/mL}$, e 1.4 mg/mL , respectivamente.



5.1.3. A distribuição de tamanhos na formulação DOD/AnB em função do tempo e da temperatura: estabilidade

Figura 9. Intensidades da distribuição dos tamanhos e diâmetro efetivo meio, \pm desvio padrão ($D_z = \text{nm}$), para DOD/AnB disperso em água aos 25°C. (A) AnB (30 $\mu\text{g/mL}$); (B), nanofragmentos de DODAB 10 mg/mL obtidos por sonicação com tip. C, D, E, e F, formulação DOD/AnB: 1 h (C); 24 h (D); 7 dias (E) e 15 dias (F) após preparado. A concentração final de AnB e DODAB no experimento foi 30 $\mu\text{g/mL}$, e 6 mg/mL , respectivamente.

Em função do tempo, a AnB foi incorporada proporcionalmente nos fragmentos de bicamada. Após 24 h de interação, a AnB atinge uma estabilidade coloidal que se estende por mais de 15 dias, estabilidade a qual é preservada na temperatura ambiente.

5.1.4. O efeito de tempo e da temperatura sobre a distribuição de tamanhos na formulação DOC/AnB.

Em função do tempo e da temperatura, a formulação DOC/AnB apresentou uma rápida instabilidade coloidal, porém, uma baixa temperatura retarda este fenômeno.

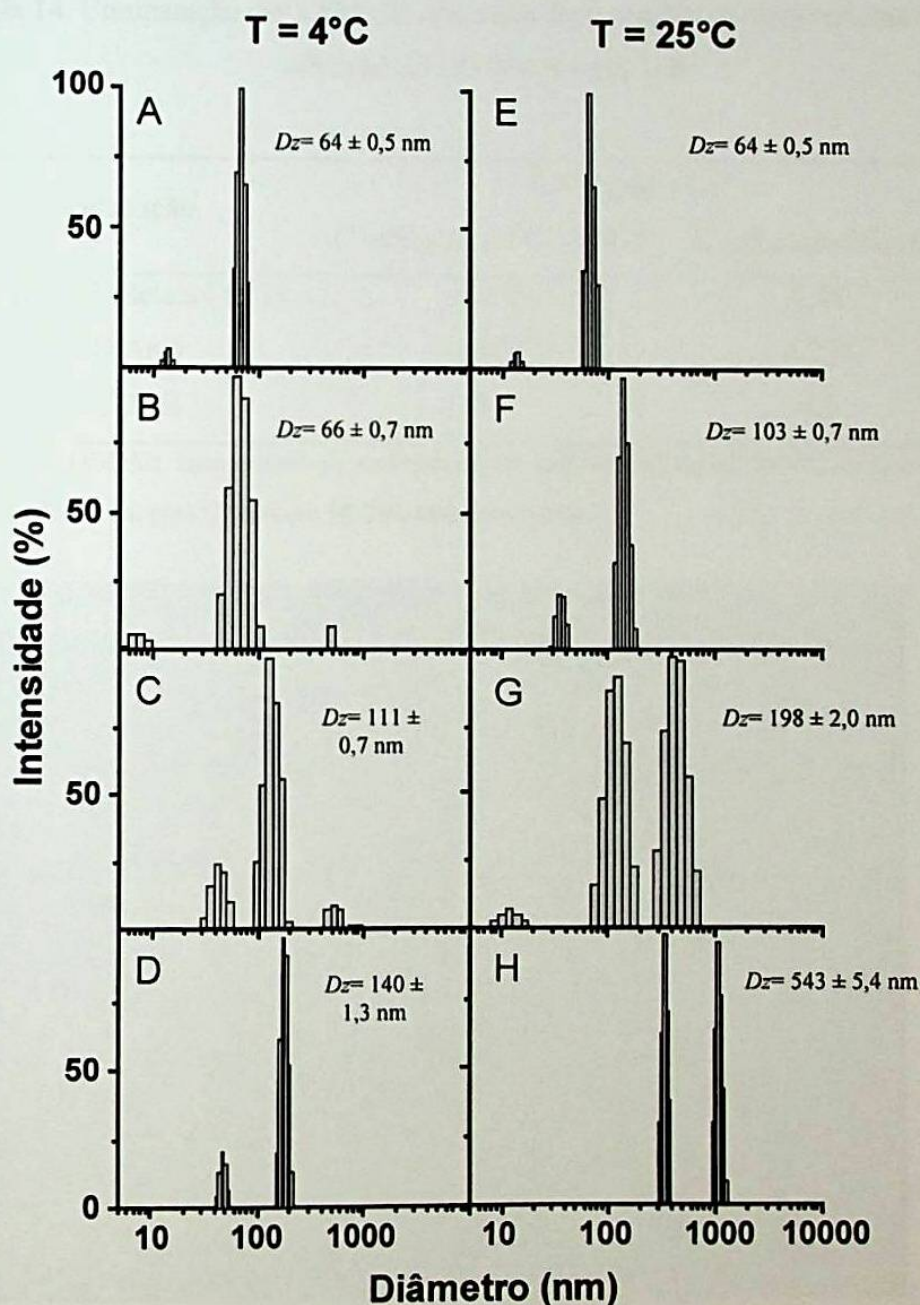


Figura 10. Intensidades da distribuição dos tamanhos e diâmetro efetivo meio (D_z = nm) para DOC/AnB disperso em água aos 4°C, esquerda (A, B, C, D), e aos 25°C, direita (E, F, G, H), no instante 1 h (A, E); 24 h (B, F); 7 dias (C, G) e 15 dias (D, H) após preparado. Concentração de AnB no ensaio = 30 $\mu\text{g/mL}$.

5.2. Avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo* da formulação DOD/AnB

5.2.1. Avaliação da atividade *in vitro*

Tabela 14. Comparação das CFMs de diferentes formulações de Anfotericina B para *C. albicans* ATCC 90028 e HU168

Formulação	CFM ($\mu\text{g/mL}$)*	
	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> HU168
AnB/DMSO:Metanol (1:1)	0,125	0,25
DOD/AnB	0,125	0,250
DOC/AnB	0,5	0,5

* A CFM do DODAB, independente da incorporação de AnB, foi: 250 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* ATCC 90028, e 500 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* HU168, respectivamente.

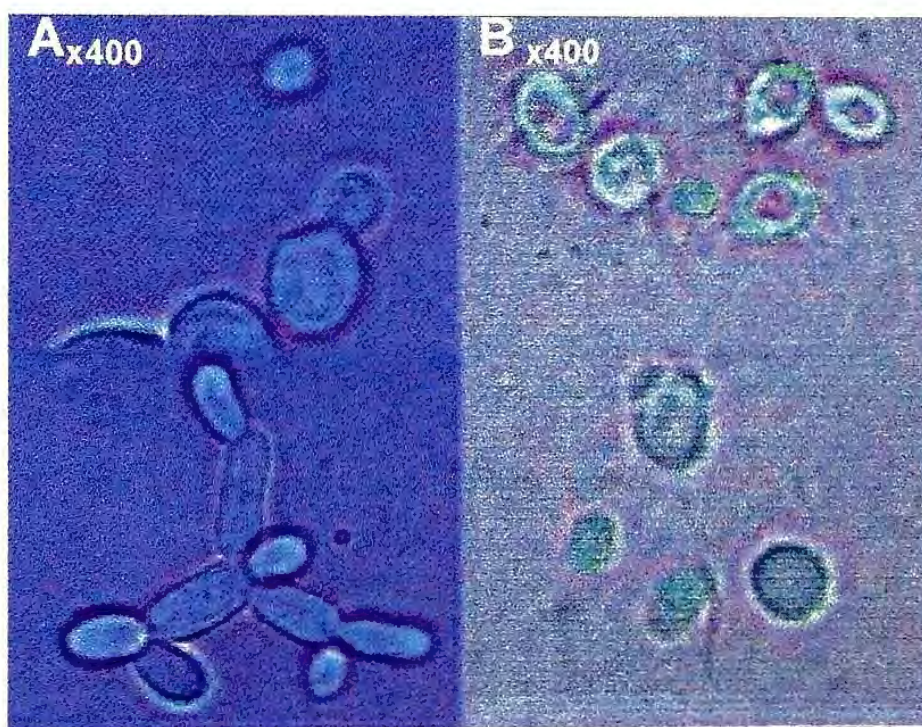


Figura 11. Atividade *in vitro* de DOD/AnB após 1 hora de interação com *C. albicans* ATCC 9028: (A), tempo "0"; (B), 1 hora após adição de DOD/AnB. A concentração final de AnB na interação foi 250 $\mu\text{g/mL}$. O inóculo corresponde a 10^6 UFC/mL (escala 0,5 de McFarland)

5.2.2. Avaliação da atividade in vivo

5.2.2.1. Análise de sobrevivência

A administração i.p. de DOD/AnB, 0.4 mg/kg/dia x 10 dias, abrangeu 100% de sobrevivência nos animais infectados.

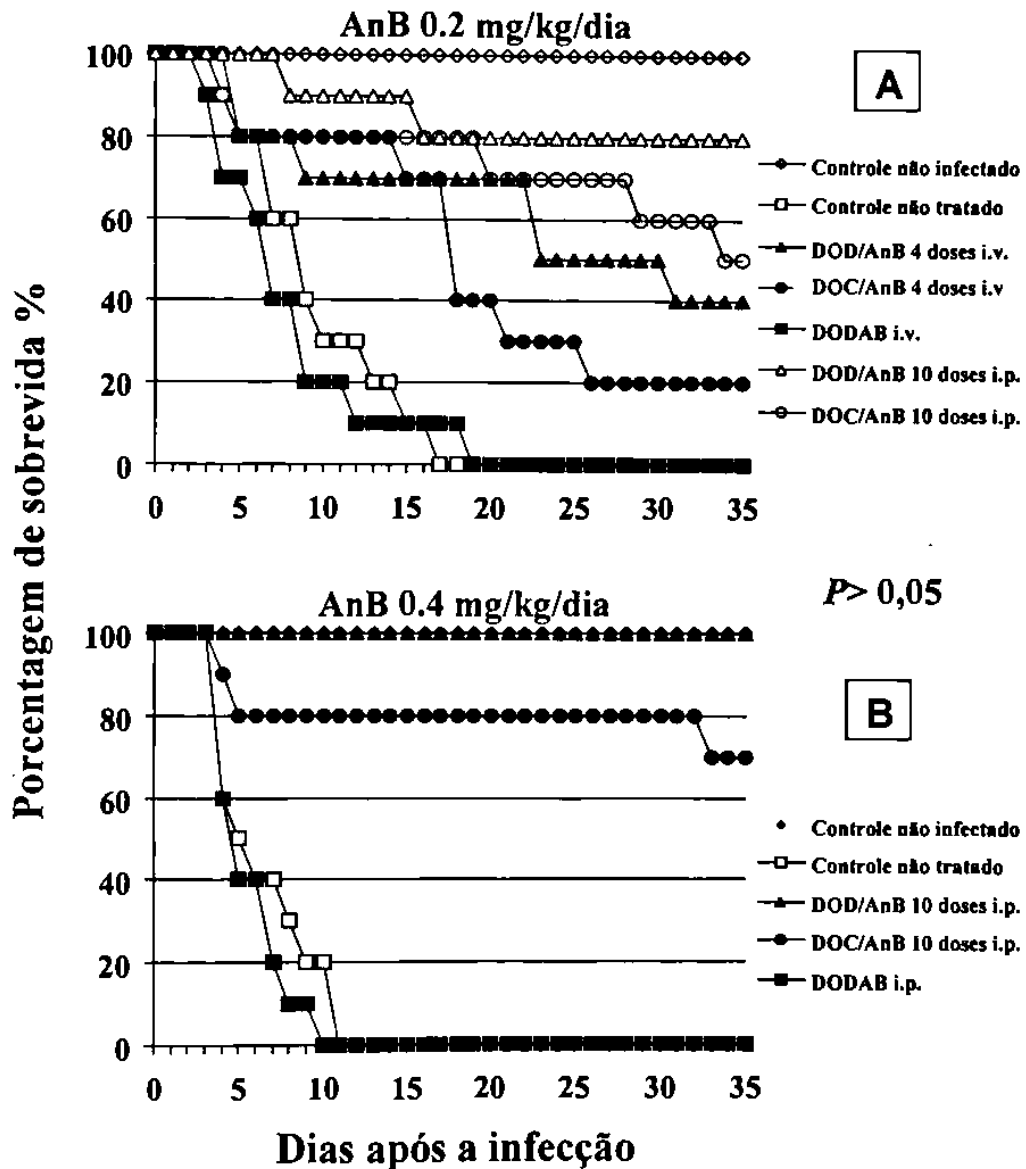


Gráfico 2. (A) Sobrevivência de camundongos infectados com a cepa de *C. albicans* HU 168, 10^5 UFC/camundongo, e tratados 24 h. após a infecção, tanto com: 1) DOD/AnB 0.2 mg/kg/dia x 4 dias i.v. (Δ), ou x 10 dias i.p. (\blacktriangle); 2) DOC/AnB 0.2 mg/kg/dia x 4 dias i.v. (\circ) ou x 10 dias i.p. (\bullet); ou 3) DODAB sem droga 40 mg/kg/dia i.v. (\blacksquare). (B) Infecção induzida como descrito anteriormente, tratada agora com: 1) DOD/AnB 0.4 mg/kg/dia x 10 dias i.p. (\blacktriangle); 2) DOC/AnB 0,4 mg/kg/dia x 10 dias i.p. (\bullet); ou 3) DODAB sem droga 80 mg/kg/dia x 10 dias i.p. (\blacksquare). Como controles foram utilizados camundongos infectados e não tratados (\square) e camundongos não infectado (\diamond).

5.2.2.2. Estudo da recuperação das leveduras do baço e rins

Ambas formulações foram efetivas em diminuir a colonização do baço e do rim dos animais infectados ($P > 0,05$).

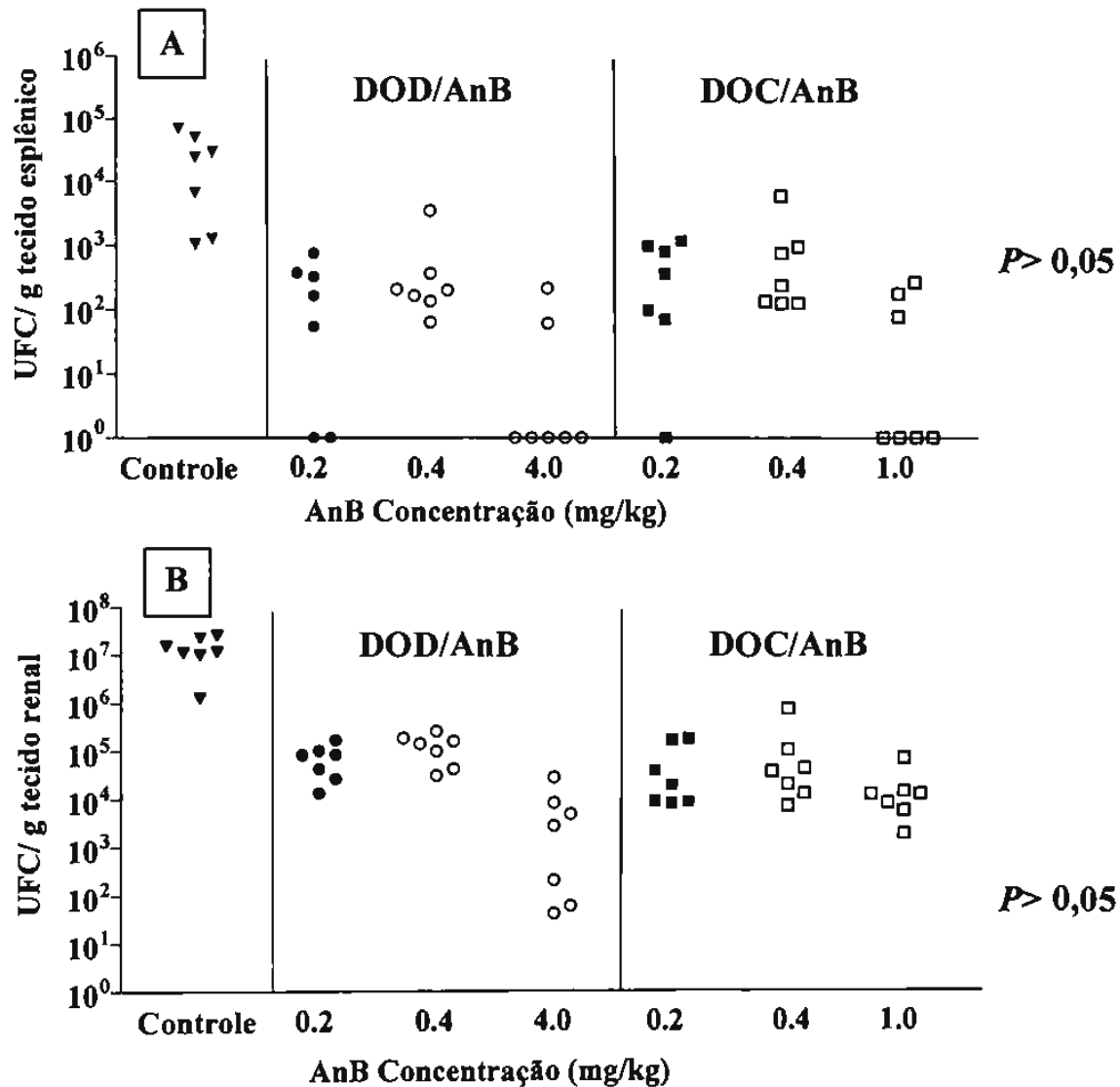


Gráfico 3. (A) Recuperação de *C. albicans* do baço de camundongos infectados 24 h. após infecção e tratados com: 1) DOD/AnB 0.2 mg/kg/dia i.v. x 4 dias (●), ou 0.4 e 4.0 mg/kg/dia i.p. x 7 dias, respectivamente (○); 2) tratados com a formulação DOC/AnB 0.2 mg/kg/dia x 4 dias i.v. (■) ou 0.4 e 1.0 mg/kg/dia x 7 dias i.p. (□). Como controle foram utilizados camundongos infectados e não tratados (▼). (B) Recuperação de *C. albicans* nos rins dos mesmos grupos anteriormente descritos. O efeito do tratamento foi determinado no 5º dia para o grupo i.v., ou no 8º dia para o grupo i.p., após infecção com 10^5 UFC *Candida albicans* HU 168/camundongo. Cada ponto do gráfico representa um valor exponencial das UFC/g de tecido, na base 10, por camundongo.

5.2.2.3. Avaliação histopatológica dos rins

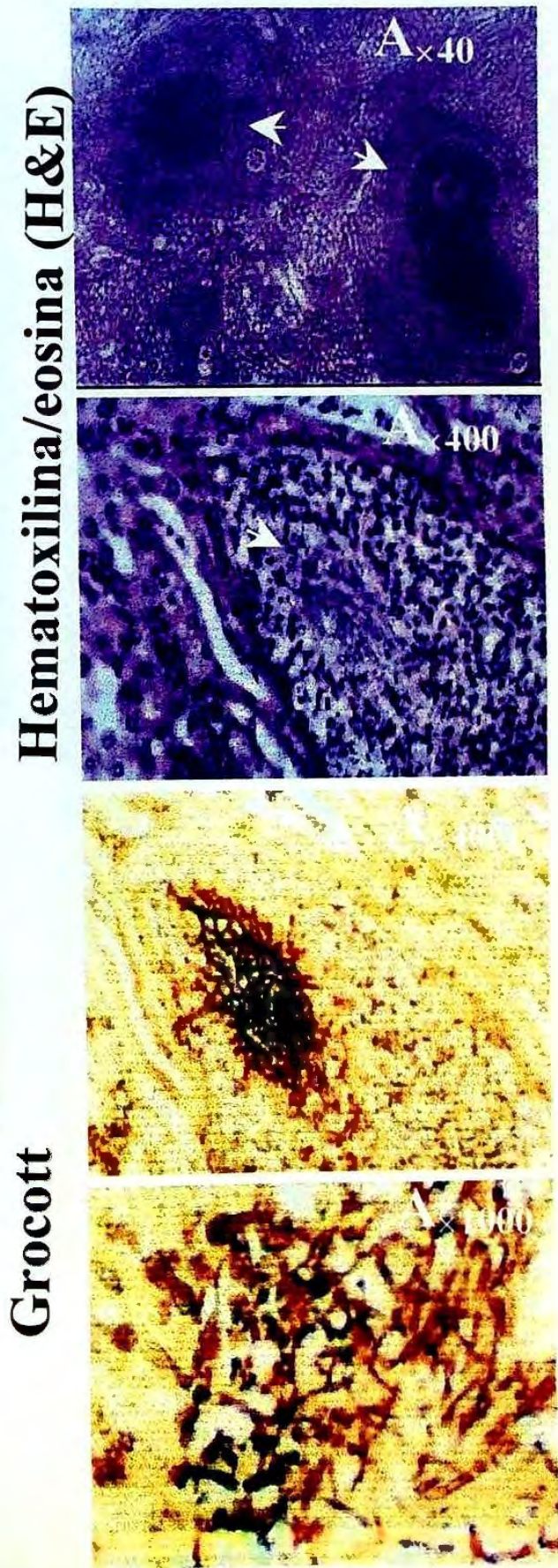
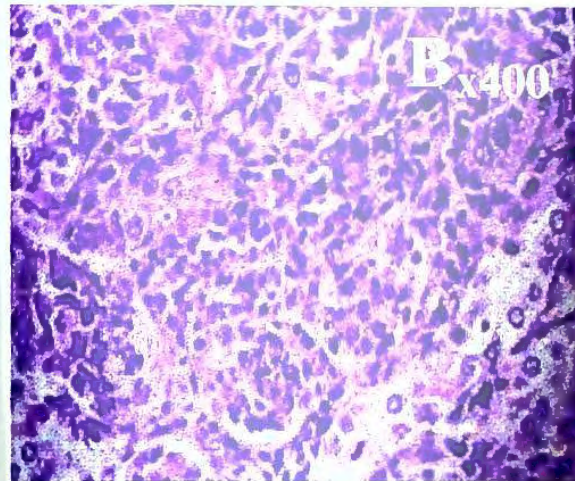
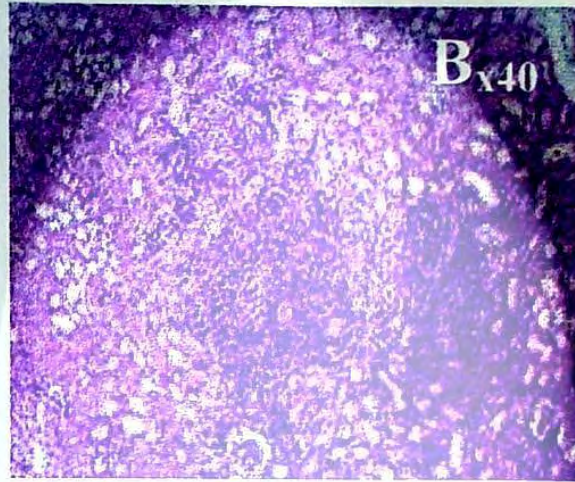


Figura 12 A

DOD/AnB

Hematoxilina/eosina (H&E)



Grocott

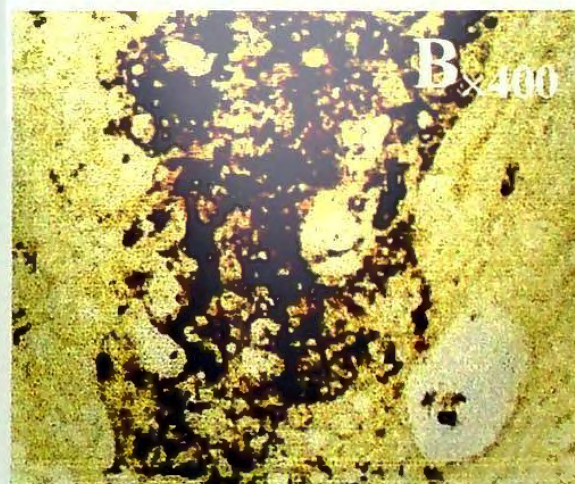


Figura 12 B

Figura 12 C

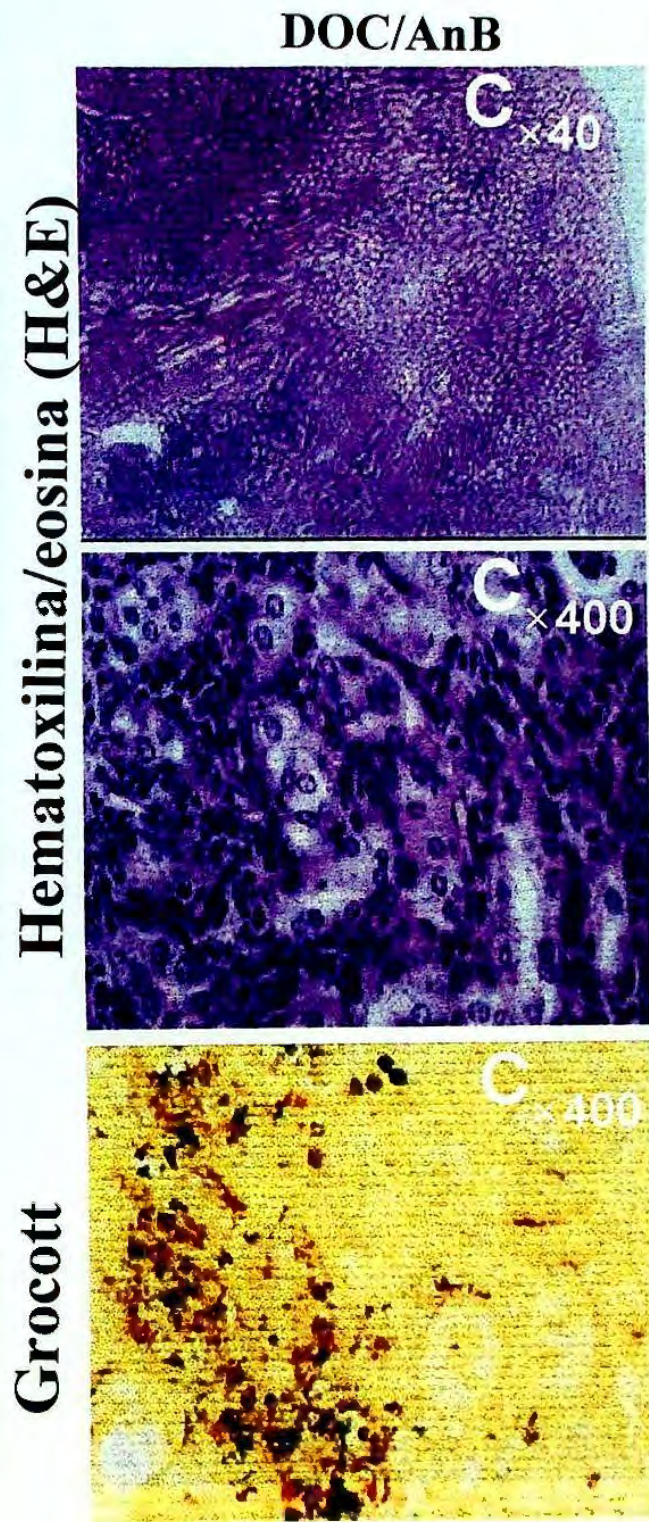
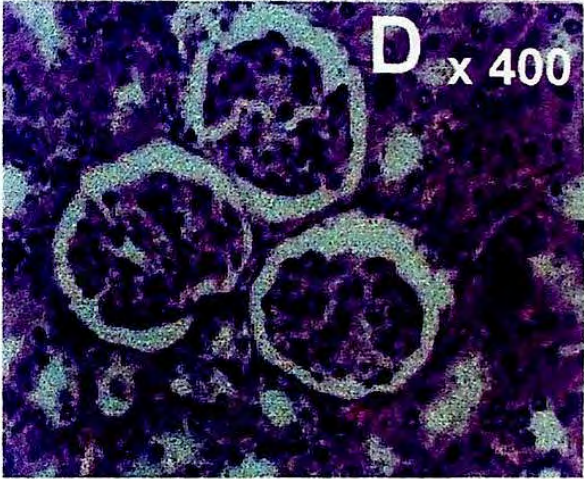
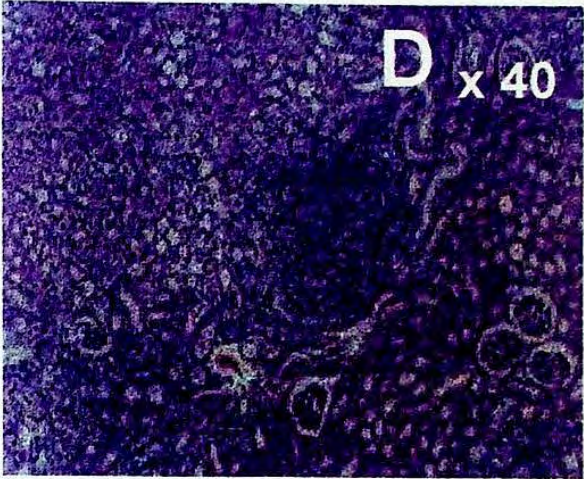


Figura 12 C

DODAB sem AnB

Hematoxilina/eosina (H&E)



Grocott

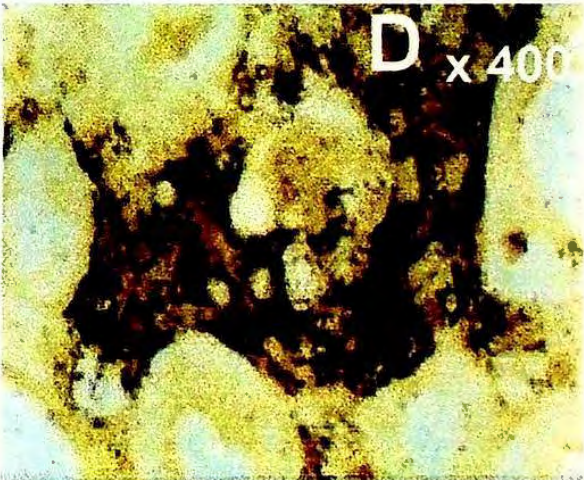


Figura 12 D

Figura 12. Imagem histológica das lesões renais observadas em camundongos infectados com a cepa de *C. albicans* HU 168, 10^5 UFC/camundongo, e tratados 24 h. após a infecção com: 1) DOD/AnB 0,2 mg/kg/dia x 4 dias i.v. (figura 12 B); 2) DOC/AnB 0,2 mg/kg/dia x 4 dias i.v. (figura 12 C); ou 3) DODAB 40 mg/kg/dia x 4 dias i.v. No 5º dia após finalizado o tratamento, foram avaliadas as alterações histológicas presentes nos rins, utilizando a coloração H&E e Grocott. (A), grupo controle infectado e não tratado: na região cortical, entre os túbulos e glomérulos, foram observados múltiplos, e extensiva formação de granulomas ($A_{\times 40}$, flechas). Na área medular ($A_{\times 400}$, flechas), túbulos com aglomeração de macrófagos e massivo infiltrado de polimorfonucleares exibiram coleções de pseudohifas e leveduras em etapa de germinação ($A_{\times 1000}$). Para ambas formulações, DOD/AnB (B) e DOC/AnB (C), foram observadas lesões menos severas, com granulomas delimitados e localizados na região cortical ($B_{\times 40}$, $C_{\times 40}$) apresentando coleções focalizadas de macrófagos e carência de polimorfonucleares ($B_{\times 400}$, $C_{\times 400}$), exibindo manchas ($B_{\times 400}$, $C_{\times 400}$), as quais foram interpretadas como produtos de degradação dos elementos fúngicos infectantes. Surpreendentemente, o grupo tratado com DODAB sem droga (D) apresentou as mesmas alterações morfológicas observadas nos grupos de animais tratados com ambas formulações de AnB. Coloração de Hematoxilina & eosina (H&E) $\times 40$, $\times 400$, e coloração de Grocott $\times 400$, $\times 1000$.

5.3. Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* da formulação DOD/AnB

5.3.1. Toxicidade *in vitro*

A formulação DOD/AnB apresentou uma menor toxicidade, *in vitro*, do que DOC/AnB para células epiteliais renais. A toxicidade de DODAB foi menor em comparação a ambas formulações, mostrando uma ação seletiva quando comparado com células fúngicas (comparar a IC₅₀ com a CFM apresentada na tabela 12).

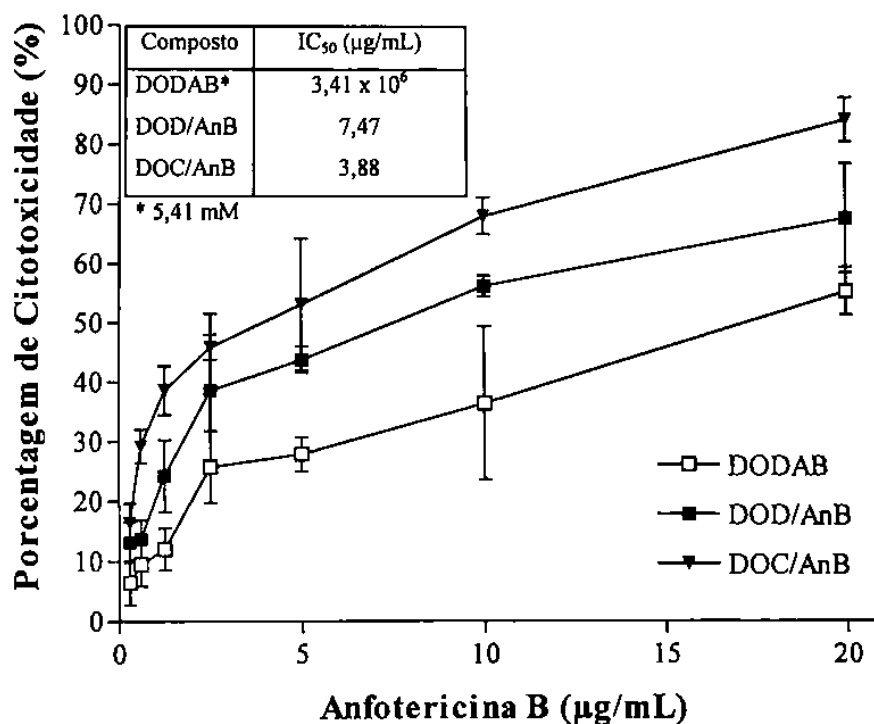


Gráfico 4. Avaliação da citotoxicidade pelo método de captura do vermelho neutro. Porcentagem de citotoxicidade de células epiteliais renais após 1 h. de incubação a 37°C, em estufa de CO₂, com concentrações de 0 a 20 µg/mL da formulação DOC/AnB (●) ou DOD/AnB (■). A concentração final de células nas misturas foi 10⁵ cel/mL. A concentração de DODAB no ensaio, independente da incorporação de AnB, foi: 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 e 4.0 g/L respectivamente.

5.3.2. Toxicidade *in vivo*: toxicidade aguda, subaguda e crônica.

5.3.2.1. Sinais de reação adversa visível nos períodos durante e após a administração de cada formulação.

Tanto durante a administração i.p. das formulações, quanto após os 10 dias de esquema terapêutico, não se observou qualquer tipo de sinal patognomônico do uso de anfotericina B nas formulações testadas. Já tanto para o carreador lipídico sem a droga como o carreador complexado com AnB observou-se uma lesão no local da inoculação similar a uma reação do tipo inflamatória, a qual foi revertendo lentamente com o transcurso dos dias de avaliação.

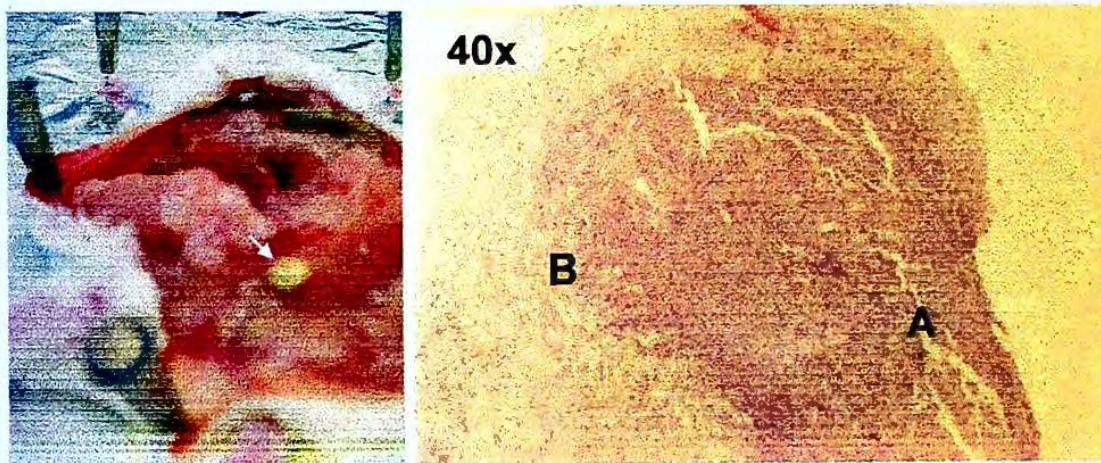


Figura 13. Administração i.p. de 240 μ L de DODAB 10 mg/mL por camundongo x 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), a incorporação de AnB. Observação macroscópica (esquerda) e histológica (direita) da lesão observada no sítio de inoculação (i.p.) nos grupos DODAB e DOD/AnB. (A), granuloma bem circunscrito com centro necrótico e debris celulares. (B), na periferia, presença de fibroblastos formando fibrose, alguns neutrófilos e colágeno (H&E).

5.3.2.2. Autopsia

A única alteração macroscópica observada durante a autópsia no décimo primeiro dia após tratamento nos grupos DODAB e DOD/AnB, além da formação do granuloma descrito anteriormente, foi o aumento do peso relativo do baço em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$), o qual gradualmente atingiu valores próximos ao do grupo controle, após 180 dias.

Um aumento moderado, não significativo foi observado no grupo DOC/AnB após 180 dias do tratamento.

Tabela 15. Efeito do DODAB e DOD/AnB sobre o peso relativo do baço, durante e após administração i.p. de 0,4 mg/kg/dia x 10 dias consecutivos.

Grupo	Avaliação (dias)	Peso corporal (g)	Peso do baço (g)	Peso do baço como porcentagem (%) do peso corporal
Controle	10	32,43 ± 2,88	0,10 ± 0,005	0,32 ± 0,03
	180	50,04 ± 7,59	0,14 ± 0,024	0,28 ± 0,02
DODAB*	10	31,05 ± 2,96	0,26 ± 0,017¹	0,83 ± 0,07¹
	180	53,02 ± 10,60	0,19 ± 0,030	0,38 ± 0,13
DOD/AnB*	10	32,86 ± 2,77	0,20 ± 0,024¹	0,63 ± 0,10¹
	180	53,66 ± 9,68	0,18 ± 0,019	0,33 ± 0,07
DOC/AnB	10	33,27 ± 4,66	0,11 ± 0,011	0,34 ± 0,07
	180	46,50 ± 10,53	0,16 ± 0,037	0,35 ± 0,09

¹ $P < 0,05$. A comparação foi realizada entre cada grupo e seu respectivo grupo controle, correspondentes ao mesmo período de avaliação.

* Administração i.p. de 240 µL de DODAB 10 mg/mL por camundongo x 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

5.3.2.3. Efeito de DOD/AnB sobre o peso corporal do modelo Swiss webster, durante e após administração i.p. de 0,4 mg/kg/dia x 10 dias

Fisiologicamente houve uma queda do peso corporal nos animais tratados, porém, a recuperação do nível basal foi atingido no final do primeiro mês após tratamento com DOC/AnB, e a meados ou ao final do segundo mês após tratamento com DOC/AnB e DODAB, respectivamente.

Tabela 16. Mudanças no peso médio durante e após a administração i.p. das formulações estudadas. Valores expressos em **gramas** (\pm desvio padrão).

Período (dias)	Tratamentos (gramas \pm desvio padrão) ¹			
	Controle	DODAB*	DOD/AnB*	DOC/AnB
0 ¹	39,16 (\pm 5,70)	33,63 (\pm 3,84)	38,53 (\pm 4,12)	35,15 (\pm 3,58)
2	38,61 (\pm 5,70)	32,39 (\pm 3,68)	36,77 (\pm 3,91)	34,55 (\pm 3,40)
10	38,30 (\pm 5,59)	29,32 (\pm 2,73)	33,26 (\pm 3,33)	33,60 (\pm 3,55)
30	38,55 (\pm 5,93)	29,70 (\pm 1,25)	34,38 (\pm 3,68)	35,53 (\pm 5,92)
60	45,42 (\pm 7,54)	34,37 (\pm 4,89)	41,16 (\pm 4,21)	40,87 (\pm 4,65)
90	48,75 (\pm 7,65)	36,98 (\pm 4,20)	44,12 (\pm 4,32)	44,44 (\pm 5,46)
180	58,03 (\pm 8,44)	48,60 (\pm 5,28)	53,77 (\pm 6,49)	54,58 (\pm 6,90)

¹ Previa administração do esquema terapêutico;

* Administração i.p. de 240 μ L de DODAB 10 mg/mL por camundongo x 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

Gráfico 5. Mudanças no peso médio durante e após a administração i.p. das formulações estudadas. Valores expressos em **porcentagem** (%).

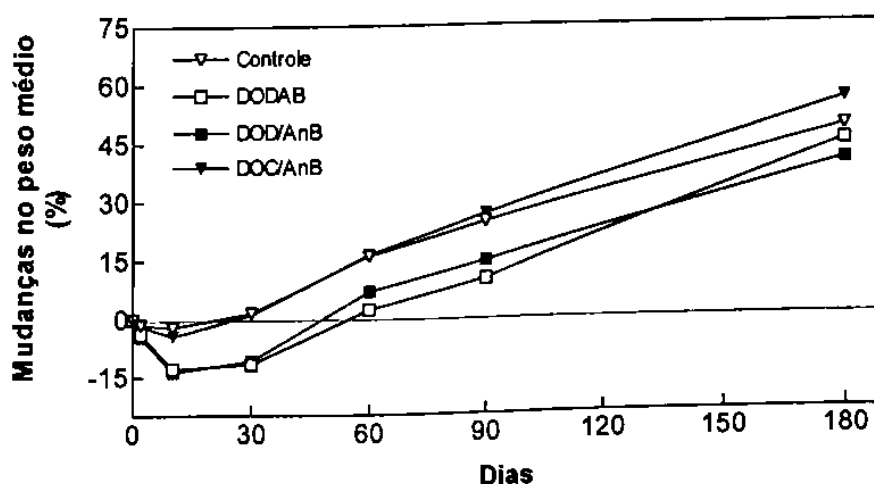


Gráfico 5. Efeito dos 10 dias de administração de AnB (0.4 mg/kg/dia) como DOD/AnB (■) ou DOC/AnB (▼) sobre o peso corporal de camundongos tratados. Valores expressos como porcentagem na mudança do peso médio respeito ao peso inicial, antes da terapia. O grupo DODAB sem AnB (□), e o grupo controle sem tratamento (○), foram inoculados i.p. com 240 µL de DODAB 10 g/L por camundongo (80 mg/kg/dia) e solução isotônica de D-glicose estéril 5% (0.264 M), respectivamente.

5.3.2.4. Testes Bioquímicos

Após décimo dia de tratamento não foram observadas alterações na função hepática e renal, nos animais tratados com DODAB, DOD/AnB ou DOC/AnB ($P > 0,05$).

Tabela 17. Parâmetros bioquímicos (média \pm desvio padrão) obtidos desde camundongos tratados com DODAB, DOD/AnB ou DOC/AnB (AnB 0.4 mg/kg/dia x 10 dias consecutivos).

Grupo	Parâmetros Bioquímicos (UI ou mg/dL \pm desvio padrão) ^b				
	ALT ^a (UI/L)	AST ^a (UI/L)	ALP ^a (UI/L)	Creatinina (mg/dL)	Uréia (mg/dL)
Controle	86,36 \pm 81,85	90,59 \pm 40,31	303,72 \pm 57,57	0,98 \pm 0,06	59,62 \pm 4,91
DODAB*	71,80 \pm 55,66	118,02 \pm 28,66	314,03 \pm 76,70	0,93 \pm 0,05	53,13 \pm 6,77
DOD/AnB*	80,57 \pm 41,70	107,93 \pm 3,40	318,93 \pm 16,27	0,97 \pm 0,08	55,74 \pm 18,7
DOC/AnB	121,20 \pm 57,96	121,85 \pm 21,71	343,60 \pm 50,95	0,94 \pm 0,06	50,17 \pm 7,73

* Administração i.p. de 240 µL de DODAB 10 mg/mL por camundongo x 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

^a ALT, alanino aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALP, fosfatase alcalina.

^b Média \pm mais desvio padrão dos 4 a 5 pool de soro por cada regime terapêutico

Ao contrário, foi observada uma diminuição nos níveis de ferro sérico, nos animais tratados com DODAB ou DOD/AnB ($P < 0,05$), neste mesmo período de estudo.

Tabela 18. Dosagem de Ferro (mg/dL, média \pm desvio padrão) de camundongos tratados com DODAB, DOD/AnB ou DOC/AnB (AnB 0.4 mg/kg/dia x 10 dias consecutivos de tratamento).

Tratamentos (mg/dL \pm desvio padrão) ¹			
Controle	DODAB*	DOD/AnB*	DOC/AnB
303,84 \pm 32,74	225,56 \pm 18,10 ¹	211,83 \pm 47,70 ¹	292,75 \pm 73,73

¹ $P < 0,05$

* Administração i.p. de 240 μ L de DODAB 10 mg/mL por camundongo x 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

5.3.2.5. Testes Hematológicos

5.3.2.5.1. Hemograma

No sangue periférico, as alterações associadas ao uso de DODAB e DOD/AnB corresponderam a uma leve queda na contagem de hemácias e na concentração de hemoglobina, na série vermelha, cujos valores retornaram aos níveis basais após do 6^o mês de tratamento. Embora significativa em alguns casos ($P < 0,05$), clinicamente estas alterações não caracterizam uma anemia.

Já na séria leucocitária, observou-se uma leucocitose clínica e estatisticamente significativa ($P < 0,05$), nos grupos DODAB e DOD/AnB, a qual foi progredindo em função do tempo, aproximando-se aos valores basais, após do 6^o mês de avaliação.

Tabela 19. Número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume hematócrito, e contagem de leucócitos. Valores obtidos desde camundongos tratados com DODAB, DOD/AnB ou DOC/AnB (AnB 0.4 mg/kg/dia x 10 dias consecutivos).

Grupo	Dias de avaliação	Hemograma (número de células, g/dL ou % \pm desvio padrão) ¹			
		Hemácias (x 10 ⁶)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (x 10 ³)
Controle	10	5,12 \pm 0,16	15,9 \pm 1,2	44,2 \pm 2,4	2700 \pm 905
	180	6,47 \pm 0,41	12,9 \pm 0,8	39,8 \pm 1,8	2122 \pm 259
DODAB*	10	4,73 \pm 0,13¹	14,1 \pm 1,1¹	42,3 \pm 0,5	6350 \pm 2163¹
	180	7,13 \pm 0,26	13,2 \pm 0,5	40,4 \pm 1,5	3300 \pm 491¹
DOD/AnB*	10	4,90 \pm 0,16	13,0 \pm 2,2¹	41,6 \pm 2,9	4610 \pm 3285
	180	7,35 \pm 0,62	12,6 \pm 0,7	39,8 \pm 1,5	2810 \pm 442¹
DOC/AnB	10	5,20 \pm 0,12	16,6 \pm 1,2	44,6 \pm 1,7	2500 \pm 1030
	180	6,84 \pm 0,72	13,6 \pm 0,4	40,2 \pm 1,5	1870 \pm 362

¹ $P < 0,05$. A comparação foi realizada entre cada grupo e se respectivo grupo controle, correspondentes ao mesmo período de avaliação.

* Administração i.p. de 240 μ L de DODAB 10 mg/mL por camundongo x 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

Especificamente esta leucocitoses correspondeu a uma neutrofilia nos grupos DODAB e DOD/AnB ($P < 0,05$), reversível após 180 dias, e uma moderada linfocitoses mantida, no período da avaliação (tabela 20).

A moderada leucocitopenia observada no grupo DOC/AnB, após 180 dias de avaliação, correspondeu a uma neutrocitopenia (tabela 20).

Tabela 20. Fórmula leucocitária: contagem diferencial de leucócitos valores absolutos ($\times \text{mm}^3 \pm$ desvio padrão) obtidos desde camundongos tratados com DODAB, DOD/AnB ou DOC/AnB (AnB 0.4 mg/kg/dia x 10 dias consecutivos).

Células	Avaliação (dias)	Tratamentos (número de células \pm desvio padrão) ¹			
		Controle	DODAB*	DOD/AnB*	DOC/AnB
Bastonetes	10	-	52 \pm 62¹	16 \pm 23	-
	180	-	-	-	-
Segmentados	10	359 \pm 313	2735 \pm 1182¹	1347 \pm 1080	272 \pm 85
	180	264 \pm 44	273 \pm 43	284 \pm 75	158 \pm 74¹
Eosinófilos	10	8 \pm 17	18 \pm 37	17 \pm 19	33 \pm 35
	180	5 \pm 12	-	11 \pm 15	-
Linfócitos	10	2313 \pm 647	3284 \pm 933	3162 \pm 2283	2168 \pm 935
	180	1776 \pm 238	2928 \pm 475¹	2420 \pm 425¹	1645 \pm 264
Monócito	10	20 \pm 20	72 \pm 62	52 \pm 39	27 \pm 25
	180	75 \pm 34	99 \pm 15	96 \pm 29	67 \pm 41

¹ $P < 0,05$. A comparação foi realizada entre cada grupo e se respectivo grupo controle, correspondentes ao mesmo período de avaliação.

* Administração i.p. de 240 μL de DODAB 10 mg/mL por camundongo x 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

5.3.2.5.2. Esplenograma

Embora, na toxicidade aguda, tenha sido observada uma esplenomegalia nos grupos DOD/AnB e DODAB (tabela 15), este aumento do peso esplênico não teve como principal fator associado, o aumento da celularidade esplênica (aumento o qual não foi estatisticamente significante, tabela 21, $P > 0,05$), já que, ao contrário, os grupos crônicos que apresentaram a normalização do peso esplênico, surpreendentemente, mostraram um aumento significativo da celularidade esplênica ($P < 0,05$).

Este aumento da celularidade também foi observado no grupo crônico DOC/AnB ($P < 0,05$), onde o moderado aumento do peso esplênico, anteriormente descrito (tabela 15), poderia sem estar associado ao aumento da celularidade.

No grupo DOC/AnB crônico, este aumento da celularidade afetou principalmente as células linfocíticas (tabela 22).

Tabela 21. Contagem total de células nucleadas do baço após a administração i.p. das formulações estudadas. Valores expressos em células/mL \pm desvio padrão.

Grupos	Avaliação (dias)	Células x 10 ⁷ /mL \pm desvio padrão ¹
Controle	10	1,59 \pm 0,75
	180	1,99 \pm 0,16
DODAB*	10	2,28 \pm 0,59
	180	4,04 \pm 0,41 ¹
DOD/AnB*	10	2,12 \pm 1,12
	180	3,06 \pm 0,77 ¹
DOC/AnB	10	2,08 \pm 1,12
	180	2,70 \pm 0,12 ¹

¹ $P < 0,05$. A comparação foi realizada entre cada grupo e se respectivo grupo controle, correspondentes ao mesmo período de avaliação.

* Administração i.p. de 240 μ L de DODAB 10 mg/mL por camundongo x 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

Na toxicidade aguda, nos grupos DODAB e DOD/AnB, o aumento moderado da celularidade (tabela 22) afetou tanto: a linhagem mielóide em maturação (formas de anel e segmentados), a linhagem eritróide em maturação (eritroblastos policromáticos); e a linhagem linfóide imatura (linfoblastos). Já nos grupos crônicos, mantendo o mesmo perfil anteriormente descrito na etapa aguda, sem dúvida, a principal alteração celular associada ao aumento significativo da celularidade, foi o aumento da linhagem linfocítica madura (linfócitos, tabela 22).

Tabela 22. Contagem diferencial de células esplênicas. Valores absolutos ($\times 10^6/\text{mL} \pm$ desvio padrão) obtidos desde camundongos tratados i.p. com DODAB, DOD/AnB ou DOC/AnB (AnB 0.4 mg/kg/dia \times 10 dias consecutivos).

Células ($\times 10^6/\text{mL}$)	Avaliação (dias)	Tratamentos (número de células \pm desvio padrão) ¹			
		Controle	DODAB*	DOD/AnB*	DOC/AnB
Mieloblastos	10	0,13 \pm 0,23	0,14 \pm 0,17	0,49 \pm 0,22	0,13 \pm 0,06
	180	0,90 \pm 0,09	1,44 \pm 0,05¹	1,49 \pm 0,46¹	1,02 \pm 0,29
Formas jovens	10	0,03 \pm 0,06	0,47 \pm 0,42	0,96 \pm 0,86	0,02 \pm 0,04
	180	0,23 \pm 0,06	0,29 \pm 0,21	0,09 \pm 0,17	0,20 \pm 0,14
Formas de anel	10	0,50 \pm 0,48	1,67 \pm 0,34¹	2,24 \pm 0,99¹	0,27 \pm 0,06
	180	0,66 \pm 0,11	1,41 \pm 0,34¹	0,93 \pm 1,00	0,60 \pm 0,44
Segmentado	10	0,64 \pm 0,32	1,41 \pm 0,56¹	1,83 \pm 0,74¹	0,29 \pm 0,20
	180	0,83 \pm 0,44	1,82 \pm 0,34¹	1,21 \pm 0,68	1,02 \pm 0,58
Eosinófilos	10	0,06 \pm 0,13	0,08 \pm 0,13	0,21 \pm 0,14	0,07 \pm 0,11
	180	0,44 \pm 0,45	0,61 \pm 0,72	1,50 \pm 0,72¹	0,67 \pm 0,32
Eritroblastos jovens	10	0,20 \pm 0,18	0,77 \pm 0,35	0,17 \pm 0,08	0,16 \pm 0,07
	180	0,19 \pm 0,23	0,82 \pm 0,29¹	0,64 \pm 0,44	0,40 \pm 0,33
Eritroblastos policromático	10	0,20 \pm 0,26	0,40 \pm 0,39	0,24 \pm 0,15	0,24 \pm 0,16
	180	0,20 \pm 0,23	0,24 \pm 0,18	0,34 \pm 0,46	0,20 \pm 0,26
Eritroblastos ortocromático	10	1,20 \pm 0,47	3,79 \pm 2,23	5,13 \pm 2,28¹	1,40 \pm 1,45
	180	1,21 \pm 0,28	3,37 \pm 0,76¹	2,67 \pm 0,71¹	1,42 \pm 0,47
Linfoblastos	10	0,46 \pm 0,27	1,96 \pm 0,65¹	0,74 \pm 0,56	1,81 \pm 1,47
	180	0,16 \pm 0,21	0,22 \pm 0,16	0,38 \pm 0,28	0,14 \pm 0,16
Linfócitos	10	15,83 \pm 4,57	11,52 \pm 2,36	16,61 \pm 2,70	14,28 \pm 7,35
	180	16,70 \pm 2,37	31,05 \pm 4,00¹	27,45 \pm 5,82¹	21,03 \pm 1,76¹
Plasmócito	10	0,11 \pm 0,15	0,02 \pm 0,05	0,06 \pm 0,09	0,03 \pm 0,05
	180	0,05 \pm 0,09	0,10 \pm 0,19	0,24 \pm 0,32	0,27 \pm 0,23

¹ $P < 0,05$. A comparação foi realizada entre cada grupo e se respectivo grupo controle, correspondentes ao mesmo período de avaliação.

* Administração i.p. de 240 μL de DODAB 10 mg/mL por camundongo \times 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

5.3.2.5.3 Mielograma

Uma alteração na celularidade da medula óssea foi observada após 180 dias de tratamento, e afetou todos os grupos de animais sob tratamento ($P < 0,05$).

Tabela 23. Contagem de células da medula óssea após administração i.p. das formulações estudadas. Valores expressos x mL \pm desvio padrão.

Grupos	Avaliação (dias)	Células x 10 ⁷ /mL \pm desvio padrão
Controle	10	0,71 \pm 0,41
	180	1,17 \pm 0,17
DODAB*	10	0,98 \pm 0,13
	180	1,66 \pm 0,10¹
DOD/AnB*	10	0,93 \pm 0,28
	180	1,92 \pm 0,11¹
DOC/AnB	10	0,74 \pm 0,07
	180	1,52 \pm 0,12¹

¹ $P < 0,05$. A comparação foi realizada entre cada grupo e seu respectivo grupo controle, correspondentes ao mesmo período de avaliação.

* Administração i.p. de 240 μ L de DODAB 10 mg/mL por camundongo x 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

O estudo de diferenciação celular quantitativa revelou que na série mielóide, dos grupos DODAB e DOD/AnB, houve um aumento nas formas de anel e segmentado, sendo mais evidente no período de avaliação crônica ($P < 0,05$). Neste período também foi observada um aumento das formas de anel no grupo DOC/AnB.

Já na série eritróide precursora das hemácias (eritroblastos policromáticos), a queda também observada no grupo DOC/AnB, reverteu após 180 dias de tratamento.

Na linhagem linfóide, diferente do sangue periférico e do baço, a medula óssea apresentou uma queda no número de linfócitos em ambos grupos ($P < 0,05$, tabela 24)

Tabela 24. Contagem diferencial de células da medula óssea. Valores absolutos ($\times 10^6/\text{mL} \pm$ desvio padrão) obtidos desde camundongos tratados i.p. com DODAB, DOD/AnB ou DOC/AnB (AnB 0.4 mg/kg/dia \times 10 dias consecutivos).

Células ($\times 10^6/\text{mL}$)	Avaliação (dias)	Tratamentos (número de células \pm desvio padrão) ¹			
		Controle	DODAB*	DOD/AnB*	DOC/AnB
Mieloblastos	10	0,28 \pm 0,16	0,28 \pm 0,13	0,55 \pm 0,27	0,19 \pm 0,07
	180	0,33 \pm 0,12	0,45 \pm 0,09	0,82 \pm 0,33¹	0,52 \pm 0,26
Formas jovens	10	0,61 \pm 0,30	1,03 \pm 0,41	1,1 \pm 0,65	0,47 \pm 0,10
	180	0,66 \pm 0,17	1,42 \pm 0,45¹	1,65 \pm 0,80	0,88 \pm 1,08
Formas de anel	10	1,71 \pm 0,59	2,94 \pm 1,80	3,00 \pm 0,79¹	1,56 \pm 0,48
	180	1,46 \pm 0,19	4,79 \pm 1,30¹	4,34 \pm 1,49¹	3,80 \pm 0,97¹
Segmentado	10	1,73 \pm 1,25	2,51 \pm 0,67	2,13 \pm 0,94	0,99 \pm 0,31
	180	2,86 \pm 1,20	3,74 \pm 1,02	3,87 \pm 1,13	2,66 \pm 0,25
Eosinófilos	10	0,30 \pm 0,20	0,35 \pm 0,15	0,38 \pm 0,22	0,23 \pm 0,09
	180	0,23 \pm 0,17	0,59 \pm 0,21	0,49 \pm 0,19	0,21 \pm 0,07
Proeritroblastos	10	0,28 \pm 0,25	0,25 \pm 0,19	0,24 \pm 0,15	0,21 \pm 0,12
	180	0,33 \pm 0,16	0,44 \pm 0,11	0,39 \pm 0,17	0,47 \pm 0,21
Eritroblastos basófilos	10	0,55 \pm 0,55	0,40 \pm 0,23	0,37 \pm 0,31	0,45 \pm 0,12
	180	0,47 \pm 0,13	0,46 \pm 0,22	0,50 \pm 0,15	0,52 \pm 0,05
Eritroblastos policromáticos	10	2,28 \pm 1,15	0,77 \pm 0,55¹	1,11 \pm 0,72	1,36 \pm 0,31¹
	180	3,93 \pm 0,74	2,93 \pm 0,99	3,77 \pm 0,42	2,85 \pm 1,82
Monócitos	10	0,15 \pm 0,11	0,07 \pm 0,14	0,12 \pm 0,15	0,06 \pm 0,03
	180	0,15 \pm 0,07	0,32 \pm 0,17	0,25 \pm 0,28	0,21 \pm 0,15
Linfoblastos	10	0,01 \pm 0,02	-	-	-
	180	0,10 \pm 0,12	0,03 \pm 0,04	0,18 \pm 0,24	0,50 \pm 0,31
Linfócitos	10	2,60 \pm 1,12	1,06 \pm 0,43¹	0,37 \pm 0,19¹	1,84 \pm 0,25
	180	1,47 \pm 0,78	1,51 \pm 0,81	2,57 \pm 1,01	2,75 \pm 0,86

¹ $P < 0,05$. A comparação foi realizada entre cada grupo e seu respectivo grupo controle, correspondentes ao mesmo período de avaliação.

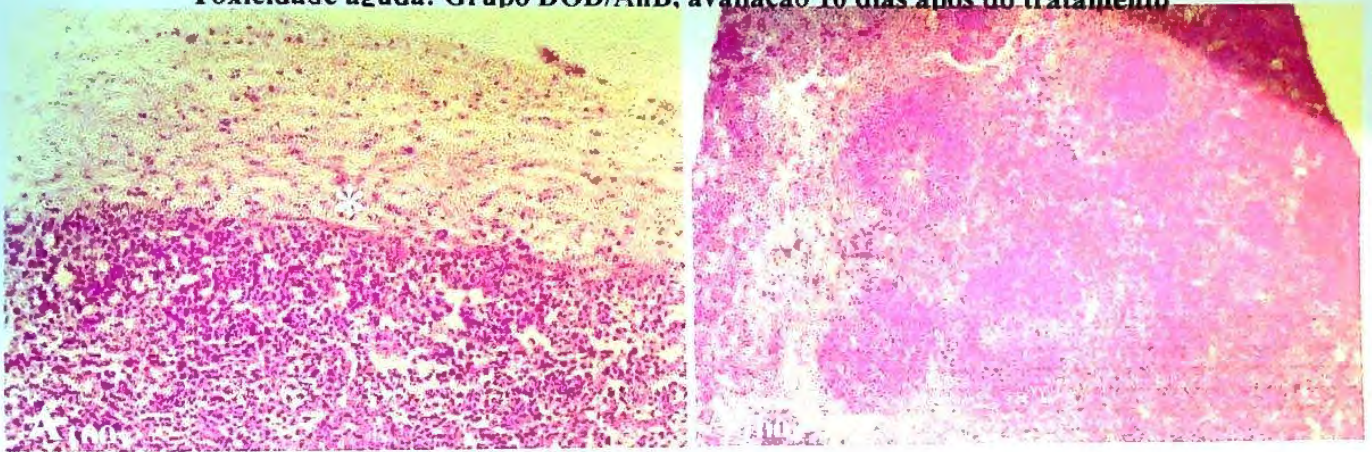
* Administração i.p. de 240 μL de DODAB 10 mg/mL por camundongo \times 10 dias consecutivos (80 mg/kg/dia), independente da incorporação de AnB.

5.3.2.6. Avaliação Histopatológica

Imagem histológica das lesões esplênicas observadas nos animais tratados com DODAB, DOD/AnB Coloração H&E.

Lesões esplênica similares foram observadas nos grupos DODAB e DOD/AnB, e corresponderam principalmente ao espessamento da cápsula esplênica. Adicionalmente na etapa crônica foi observada a presença de infiltrado inflamatório mononuclear subjacente.

Toxicidade aguda: Grupo DOD/AnB, avaliação 10 dias após do tratamento



Toxicidade crônica: Grupo DODAB, avaliação seis meses após do tratamento

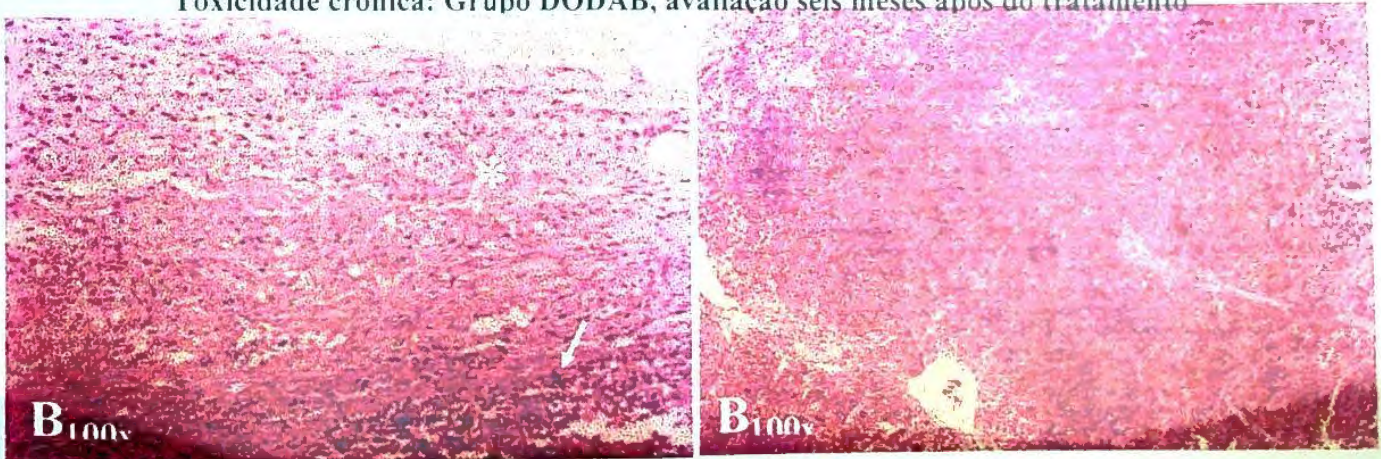
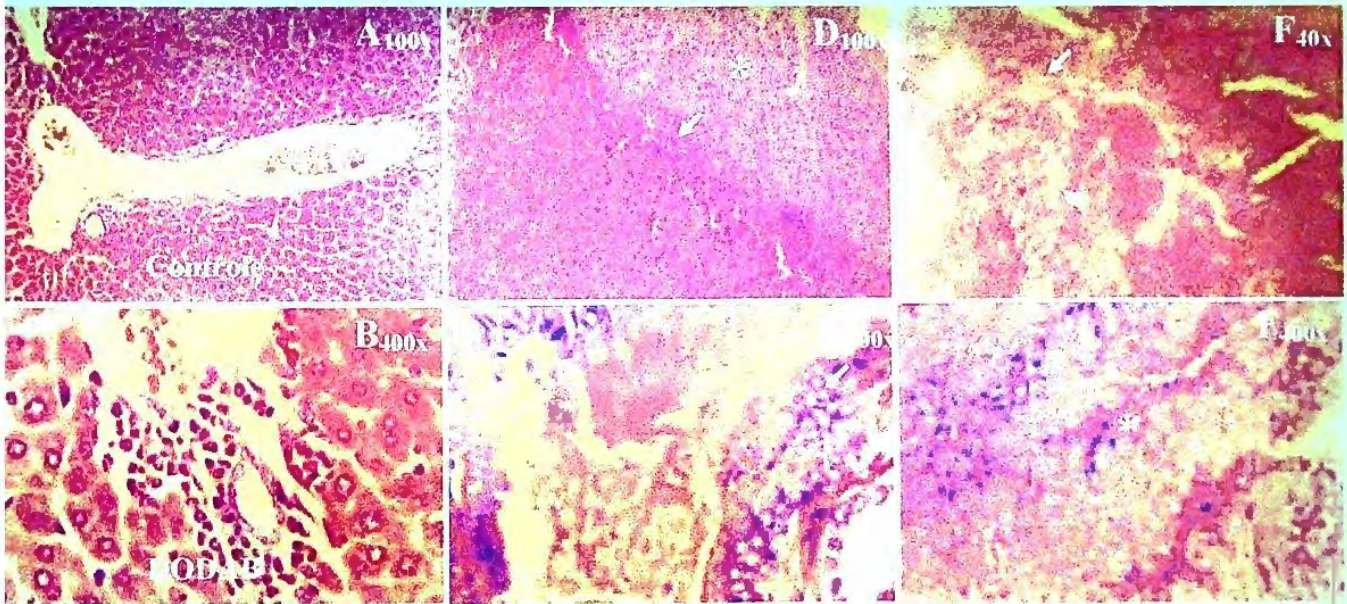


Figura 13. Alterações histopatológicas encontradas nos grupos DODAB E DOD/AnB (H&E). (A), grupo DOD/AnB, figura esquerda: espessamento (*) moderado da cápsula esplênica (sem infiltrados), com margens compostas por fibroblastos e colágeno; figura direita: leve hiperplasia de polpa branca e leve congestão. (B), grupo DODAB: direita, moderada/intensa hiperplasia de polpa branca e discreta congestão esplênica, a esquerda observa-se espessamento da cápsula esplênica (*) com infiltrado mononuclear subjacente (flecha).

Imagem histopatológica das lesões hepáticas observadas nos animais tratados com DODAB, DOD/AnB ou DOC/AnB (AnB 0.4 mg/kg/dia x 10 dias consecutivos). Coloração H&E.

Toxicidade aguda: Avaliação 10 dias após do tratamento



Toxicidade crônica: avaliação 180 dias após do tratamento

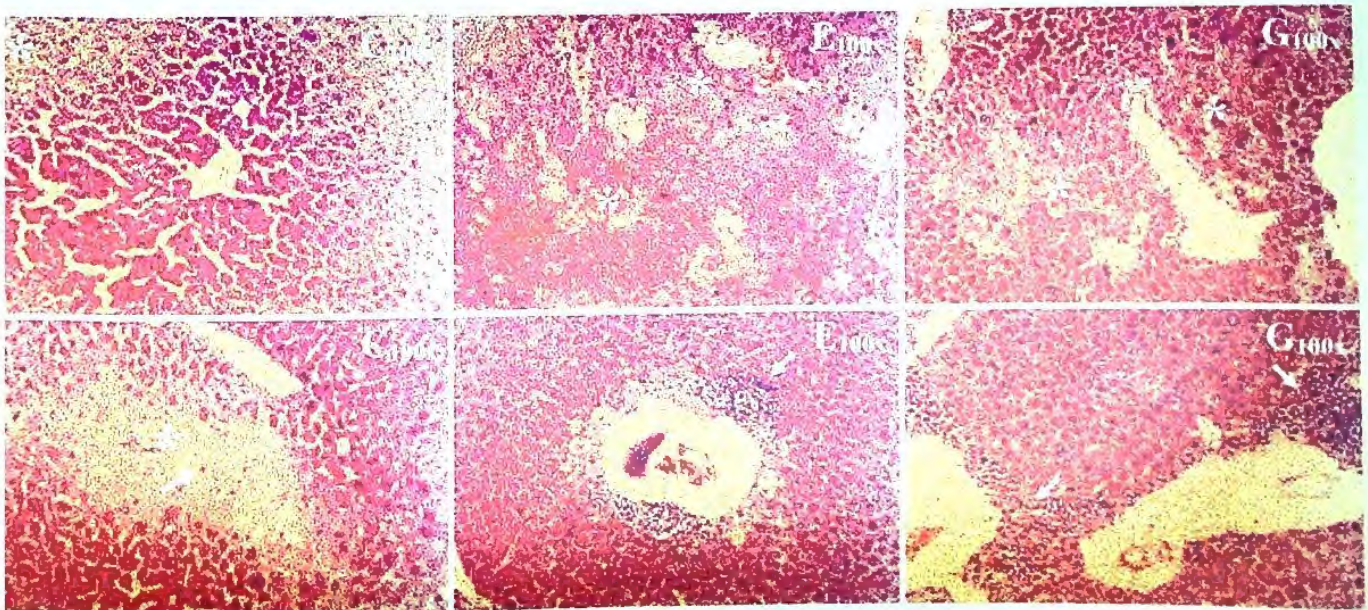
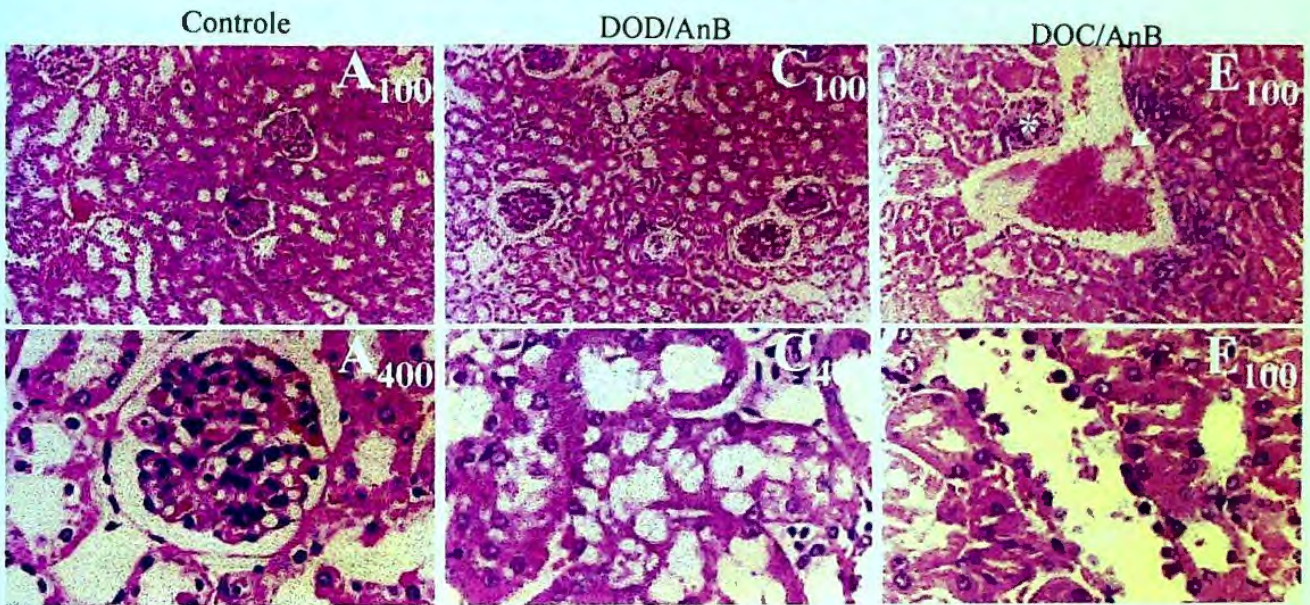


Figura 14. Grupo DODAB (B, C). Presença de manguitos perivasculares hepáticos (flecha, B_{x400}). (C, superior), áreas degenerativas localmente extensas (*), ao centro, área preservada. (C inferior), foco necrótico (*) mostrando células em picnose (flecha). Grupo DOD/AnB. Grupo DOD/AnB (D, E), espessamento focal da cápsula hepática (*, D_{x100} superior) com infiltrado focal predominante polimorfonuclear neutrofílico (flecha). No mesmo grupo (D_{x400} inferior), hiperplasia/anaplasia de células epiteliais cúbicas dos ductos biliares hepáticos (flecha). Após 180 dias este grupo apresentou necroses localmente extensas com áreas hemorrágicas (*, E_{x100} superior), e infiltrado inflamatório mononuclear perivascular (flecha, E_{x100} inferior). Grupo DOC/AnB (F, G), áreas de degeneração e necrose coagulativa moderada centrolobular, áreas com indefinição do parênquima (necrose intensa flechas F_{x40}). Com aumento maior hemorragia e áreas de degeneração e necrose coagulativa moderada centrolobular. (F_{x400}). No grupo DOC/AnB 180 dias após do tratamento observa-se infiltrado mononuclear perivascular (flechas) e área multifocal necrotica (*, G_{x100}).

Histopatológico das lesões renais observadas nos animais tratados com DODAB, DOD/AnB ou DOC/AnB (AnB 0.4 mg/kg/dia x 10 dias consecutivos). Coloração H&E.

Toxicidade aguda: Avaliação 10 dias após do tratamento



Toxicidade crônica: avaliação seis meses após do tratamento

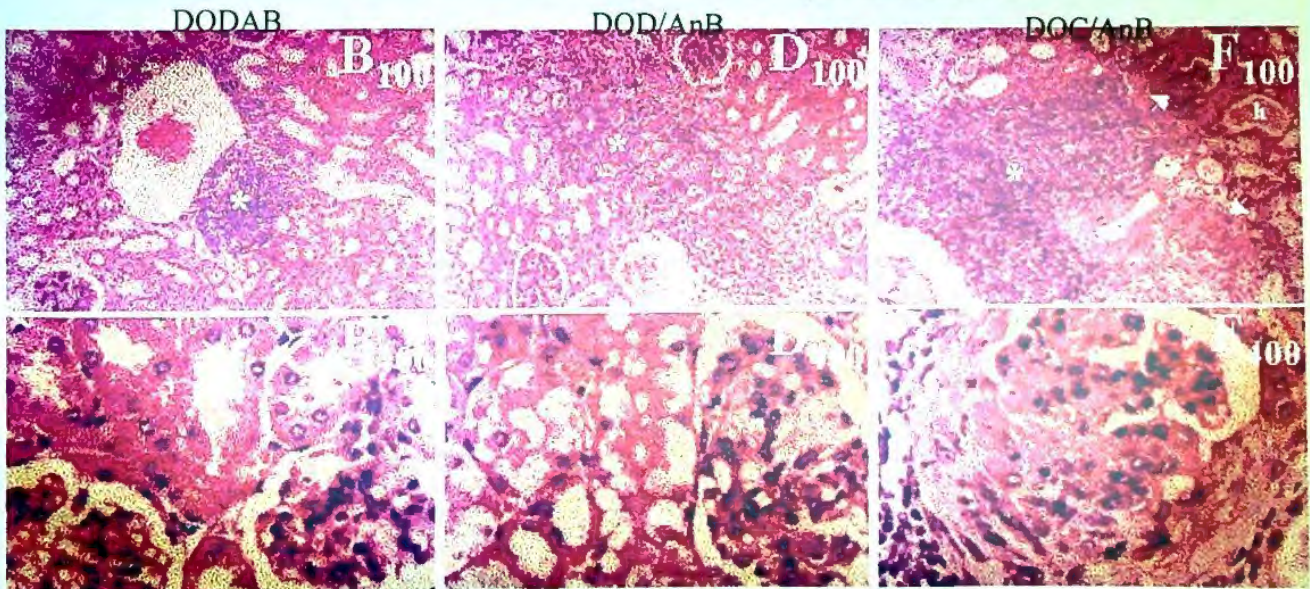


Figura 15. Histopatología das lesões renais no rim dos animais tratados (H&E). Cortes histológicos de camundongos que receberam diariamente AnB (0.4 mg/kg) como DOD/AnB (C, D) ou DOC/AnB (E, F), por 10 dias consecutivos, ou DODAB sem AnB (2.4 mg/camundongo) (B). Animais controles (A) receberam uma solução isotônica de D-glicose estéril (5% em água milli-Q). (A), região cortical com baixo e alto aumento mostrando túbulos e glomérulos normais; (B), região cortical de camundongo tratado com DODAB sem AnB, após 6º mês de tratamento. Com baixo aumento pode ser observada a presença de infiltrado linfocítico perivascular (*), e com um aumento maior pode ser observada uma degeneração hidrópica moderada. (C) Após 10 dias de tratamento com DOD/AnB pode ser observada uma região cortical normal. Com um maior, aumento nestes animais pode ser observado a presença de uma degeneração hidrópica moderada. Neste mesmo grupo, Após do 6º mês, assim como no grupo DODAB, observou-se a presença de infiltrado inflamatório linfocítico. (E), No grupo DOC/AnB (baixo aumento), um precoce infiltrado inflamatório pode ser observado já com 10 dias de terapia, ainda, este grupo apresentou degeneração cística tubular com conteúdo hemorrágico. Com aumento maior a degeneração tubular revelou a presença de debris celulares no lúmen, que consequentemente poderia bloquear a saída da urina e eventualmente aumentar a pressão intratubular gerando a formação de cistos. (F), Após 6º mês (baixo aumento), estes animais apresentaram uma projeção densa do infiltrado inflamatório linfocítico (*) e glomeruloesclerose focal (flecha), adicionalmente, a presença de cilindros hialinos (h) pode denotar uma anormal reabsorção de proteínas. Nesta mesma amostra, com aumento maior, pode ser observada a presença de massa hialina na área esclerosada.

5. Discussão

Embora ainda não se tenha encontrado o antifúngico ideal, a AnB, apesar de ser altamente insolúvel e tóxica, continua sendo a droga de escolha para o tratamento de infecções fúngicas graves (GALLIS, et al., 1990; DERAY, 2002; ELLIS, 2002; DUPONT, 2002).

Classicamente o Fungizon® — suspensão coloidal de AnB carregada em micelas de desoxicolato — tem sido a principal formulação utilizada, mas nestes últimos anos, na tentativa de eliminar o problema da nefrotoxicidade associada ao seu uso, inovadoras formulações lipídicas surgiram como alternativa. Dentre estas, atualmente disponível no mercado encontra-se o Ambisome®, formulação propriamente lipossomal; Abelcet® (ABLC), complexo lipídico com uma estrutura em forma de tiras “*ribbon-like*”; e o Amphocil® ou Amphotec®, dispersão coloidal no formato de discos. Além do elevado custo destas novas formulações, um fator limitante no momento da prescrição tem sido o emprego de altas doses, necessárias para atingir uma efetividade equivalente ao Fungizon®, dose que varia dentre 3 - 5 mg/kg/dia dependendo da formulação prescrita. A baixa eficiência tem levado a uma controvérsia médica em relação ao uso de altas doses versus uma diminuição dos efeitos colaterais, onde estudos randômicos têm mostrado que a toxicidade destas formulações em ordem decrescente seria: Ambisome < Abelcet < Amphocil (SHARKEY et al., 1996; WALSH et al., 1999; WINGARD et al., 2000; CARRIGAN & HANF-KRISTUFEK, 2001; DUPONT, 2002; GERBAUD et al., 2003).

Assim, além da necessidade de estudar alternativas terapêuticas menos onerosas que as formulações de lipídeos naturais já disponíveis no mercado, a recente descrição da solubilização de AnB por lipídeos sintéticos nos inspirou a avaliar a atividade de uma nova formulação usando fragmentos de bicamada do versátil DODAB, formulação denominada de DOD/AnB.

Os ensaios seguiram ordem sequencial em etapas que compreenderam a caracterização físico-química da dispersão DOD/AnB, a avaliação da atividade fungicida *in*

vitro e *in vivo*, e a avaliação da toxicidade associada a um esquema terapêutico efetivo que permitisse a sobrevivência de um modelo murino sob candidíase sistêmica severa.

5.1. Caracterização físico-química da AnB solubilizada em nanofragmentos de bicamada de DODAB

Os experimentos apresentados na primeira parte do estudo mostram o estado de agregação da AnB quando solubilizada em nanofragmentos de bicamada de DODAB, e a estabilidade coloidal da formulação em função do tempo.

Na condição experimental descrita, 10 mg/mL de uma dispersão de nanofragmentos de bicamada de DODAB obtidos por sonicação com tip, solubilizaram AnB numa concentração $\leq 0,1$ mg/mL, em ausência de qualquer solvente orgânico (figura 7).

Do ponto de vista da solubilização, alguns autores têm relatado que a toxicidade dos antifúngicos administrados como monômeros é menor, porém, a importância do estado de agregação da AnB numa formulação, tem sido motivo de controvérsias em relação à atividade e toxicidade. Atualmente existe um consenso de que formas monoméricas sejam ativas contra células fúngicas e inativas para células humanas como, por exemplo, as hemácias. (GRUDA & DUSSAULT, 1988; BARWICZ et al., 1992).

Como citado na introdução, as suspensões aquosas de AnB podem apresentar três estados de agregação — podendo coexistir —, como monômeros ou oligômeros, ambos solúveis em água, e ainda agregados de oligômeros não solúveis em água. Experimentos *in vitro* têm demonstrado que as formas agregadas, solúveis em água, aumentam a permeabilidade ao potássio nas hemácias — sinal de toxicidade —, ao contrário dos monômeros solúveis que são menos tóxicos (LEGRAND et al., 1992). Geralmente as formas monoméricas podem ser obtidas quando a droga é solubilizada em solventes orgânicos como DMSO ou metanol, sendo mais freqüentemente usada uma mistura de ambos solventes numa razão de 1:1.

Na ausência de um solvente “ideal”, no início foram utilizados alguns surfactantes capazes de produzir a monomerização do antibiótico. Das diversas terapêuticas propostas para tratar as infecções fúngicas sistêmicas, optou-se pela utilização do desoxicolato como

carreador da insolúvel droga, formulação que foi introduzida na prática clínica em 1956 (MILLER & BATES, 1969).

Na formulação comercial DOC/AnB, coexiste uma mistura de AnB agregada, embora solúvel, com micelas mistas DOC/AnB, e desoxicolato puro (DOC). *In vivo* e *in vitro*, este sistema é altamente instável em função do tempo e da temperatura (BRAJTBURG & BOLARD, 1996; SCHREIER et al., 2000). A instabilidade é tão grande que uma simples diluição da formulação é suficiente para perder o equilíbrio do sistema e produzir a rápida agregação da droga e subsequente toxicidade (SCHREIER et al., 2000).

No complexo DOD/AnB a solubilização da AnB caracterizou-se pelo predomínio de formas monoméricas (figura 8). Ao contrário, formas agregadas de AnB foram confirmadas tanto após diluir a AnB-DMSO:Metanol (1:1) em água milli-Q, como na formulação comercial DOC/AnB. Em ambos os casos, foram obtidos absorções máximas ao redor de 326-336 nm (figura 8), que caracterizam a agregação da droga (BARWICZ et al., 1992).

A figura 9 representa a distribuição dos tamanhos dos fragmentos de DODAB incorporando AnB. O tamanho médio das partículas em suspensão coloidal mostra claramente a incorporação da AnB (figura 9A) nas bicamadas (figura 9B). Pode-se observar o gradual desaparecimento dos agregados de AnB em função do tempo (figura 9C - 9F), e a estabilidade de tal associação durante os 15 dias de estudo na temperatura dos 25°C, similar ao observado aos 4°C (dados não mostrados).

De fato, a ótima solubilização da droga em diferentes dispersões de anfílicos sintéticos foi bem caracterizada anteriormente (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2001). Embora nessa citação, tenha-se utilizado pouca quantidade de solvente, no presente experimento pode-se observar que mesmo na ausência de solvente, não houve diferenças no estado da solubilização da droga havendo, porém, menor incorporação da droga, $\leq 0,1$ mg/mL, principal desvantagem observada quando comparada ao Fungizon® (AnB 50 mg:Desoxicolato de sódio 20,2 mg, TRISSEL, 1988).

Em contraste à solubilização e estabilidade coloidal da formulação DOD/AnB, o DOC/AnB (figura 10), mostrou um aumento na distribuição dos tamanhos em função do tempo, principalmente aos 25°C. Já aos 4°C se manteve mais estável, confirmando a recomendação do fabricante em relação ao armazenamento da preparação na temperatura

de refrigeração por um tempo não superior a uma semana.

A estabilização da droga pelos fragmentos de bicamada, é uma propriedade inerente do uso do DODAB como carreador, esta notável vantagem também pode ser extrapolada na comparação com as formulações lipídicas disponíveis no mercado, as quais adicionalmente, por usar lipídeos naturais, são propensas a sofrer o processo de peroxidação lipídica que acelera ainda mais a instabilidade destas formulações.

5.2. Avaliação da atividade *in vitro* de DOD/AnB

Na avaliação da atividade *in vitro* da formulação DOD/AnB contra as cepas de *C. albicans* ATCC 90028 e HU168 — utilizada mais tarde no modelo de candidíase sistêmica induzida —, optou-se pela determinação da concentração fungicida mínima (CFM) através da subcultura do conteúdo dos tubos utilizados na CIM no meio ASD., conforme descrito anteriormente (CARMONA-RIBEIRO et al., 1983b; 1984), o principal problema observado durante a realização dos ensaios foi a instabilidade coloidal do anfílico sintético em meios de cultura recomendados pela NCCLS. Esta instabilidade relacionada à floculação do meio/inóculo acabou impossibilitando a interpretação da CIM. Como citado anteriormente, devido às características físico-químicas do DODAB, meios ricos compostos por aminoácidos, ou mesmo proteínas ou células com carga oposta ao DODAB, produzem floculação (CARMONA-RIBEIRO, 2001; 2003).

Tanto para a cepa de *C. albicans* ATCC 90028 como para a cepa patogênica HU168, a CFM do DOC/AnB foi maior que para AnB em DMSO ou DOD/AnB (tabela 14). Na interpretação dos resultados foram usados os valores de referência padronizados pela NCCLS para a CIM (tabela 9). Como era de esperar, o valor da CFM ($\mu\text{g/mL}$) para a cepa ATCC 90028 foi mais baixa que o *break point* recomendado pela NCCLS para o controle de qualidade (tabela 10), uma vez que a CFM e a CBM (concentração bactericida mínima), tanto dos antifúngicos como dos antibacterianos, sempre correspondem a uma ou duas diluições mais baixas que suas equivalentes CIMs (PFALLER & RINALDI, 1993; PFALLER et al, 1997; NCCLS, 1997).

A incorporação da AnB nas dispersões de DODAB, não afetou a atividade fungicida da droga, *in vitro*, atividade a qual foi idêntica à AnB no seu melhor solvente (DMSO:Metanol 1:1). Este fato garantiu o sucesso da solubilização pelos fragmentos de bicamada.

5.3. Avaliação da atividade *in vivo* de DOD/AnB

Uma vez confirmada a atividade *in vitro* da formulação DOD/AnB, foram realizados ensaios *in vivo*, avaliando-se a eficiência de diferentes tratamentos no modelo murino Swiss webster submetido a uma candidíase sistêmica (tabela 11)

No gráfico 2, podemos observar que a sobrevida de camundongos tratados com a formulação DOD/AnB foi proporcional ao aumento da dose usada, sendo que uma terapia de 10 dias com uma dose de AnB de 0,4 mg/kg/dia administrada intraperitonealmente (i.p) foi efetiva em conferir 100% de sobrevida nos animais infectados (gráfico 2B). Embora, a porcentagem de sobrevida para os camundongos tratados com DOD/AnB tenha sido superior que a de DOC/AnB, a análise estatística não mostrou diferenças significativas entre ambos tratamentos ($P > 0,05$).

O estudo da colonização realizado a partir da recuperação de colônias tanto do baço como dos rins, nos animais tratados, realizado em paralelo com a análise da sobrevida, mostrou que DOD/AnB foi tão eficiente quanto o DOC/AnB em reduzir a colonização do baço (gráfico 3A) e rins (gráfico 3B) ($P > 0,05$).

Ambos tratamentos reduziram significativamente a carga fúngica quando comparado ao grupo controle infetado, não tratado ($P < 0,05$).

Finalmente a análise histopatológica confirmou a redução do processo infeccioso, onde camundongos não tratados desenvolvem uma candidíase fulminante com uma resposta inflamatória crônica, caracterizada pela formação de granulomas extensos com predomínio de polimorfonucleares neutrófilos (figura 12 A_{x40}). A infecção é tão evidente que a coloração de Grocott, específica para a visualização de elementos fúngicos (figura 12

A_{x1000}), revelou a presença de estruturas micóticas com características viáveis ao microscópio.

Ao contrário, a análise histopatológica dos grupos tratados com ambas formulações denotou uma evolução favorável à contenção da infecção, com uma redução na formação de granulomas, não extensos, focalizados, e com predomínio de macrófagos e ausência de neutrófilos, quadro este histologicamente compatível com um processo reversível (figura 12 B_{x40} e 12 C_{x40}). Nestes grupos, a coloração de Grocott revelou a presença de estruturas residuais fúngicas, em resposta ao tratamento (figura 12 B_{x400} e 12 C_{x400} Grocott).

Surpreendentemente, embora o carreador lipídico não tenha influenciado na sobrevida dos animais e na colonização dos órgãos atingidos pela infecção, microscopicamente os achados histológicos foram similares aos descritos para ambas formulações (figura 12 D_{x40} e 12 D_{x400}). Este fenômeno poderia ser explicado pela inerente atividade imunoestimulante característica do DODAB, o qual será discutido posteriormente com os dados de toxicidade na última parte do trabalho apresentado. Por outro lado a atividade fungistática, *in vitro*, de vesículas de DODAB já tem sido descrita (CAMPANHÃ et al., 2001).

Neste ponto, a principal vantagem da formulação DOD/AnB, em comparação as outras formulações lipídicas comercializadas, seria sua efetividade (0,4 mg/kg/dia), lembrando que as formulações lipídicas comercializadas precisam de doses muito maiores (> 3 mg/kg/dia) para atingir uma efetividade equivalente ao DOC/AnB (0,6 mg/kg/dia) (DUPONT, 2002).

5.4. Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo*

5.4.1. Toxicidade *in vitro*

A máxima citotoxicidade observada com DOD/AnB (20 µg/mL, gráfico 4), foi significativamente mais baixa que a observada com DOC/AnB (67,823 ± 9,203 versus 84,413 ± 3,686), após 1 h de interação com as células epiteliais renais ($P < 0,05$). O carreador DODAB apresentou uma citotoxicidade máxima de ao redor de 4,0 g/L (55,523 ± 4,027).

Da mesma forma, a IC_{50} de DOD/AnB (7,47 µg/mL) foi o dobro que a IC_{50} de DOO/AnB. Para o DODAB a IC_{50} foi uma milionésima mais alta, equivalente a 5,41 mM.

Num estudo realizado por Carmona-Ribeiro e colaboradores, 50% de citotoxicidade de uma linhagem de fibroblasto murino, foi atingida após 0,5 h. de contato com uma concentração de 1,0 mM.

Em contraste com a citotoxicidade para *C. albicans*, tanto DODAB (500 µg/mL) como DOD/AnB (0,25 µg/mL de AnB e 500 µg/mL de DODAB) apresentam uma citotoxicidade seletiva quando comparado com a célula epitelial. Em ambos casos, a incorporação de AnB nos fragmentos de bicamada não apresentaram um efeito citotóxico sinérgico.

Mas tarde, como será discutido, esta menor citotoxicidade renal por parte de DOD/AnB, também foi observada, *in vivo*, no rim de camundongo tratados.

5.4.2. Toxicidade Subaguda

Como apresentado na segunda parte do presente estudo, o esquema terapêutico escolhido para o avaliar a toxicidade foi aquele que permitiu a sobrevivência de 100% dos animais submetidos a uma candidíase sistêmica (tabela 1, gráfico 2). Nesta condição, embora na anamnese não tenha sido observada qualquer reação adversa associada ao uso da

droga, independente da solubilização de AnB, o carreador lipídico gerou uma resposta inflamatória aguda granulomatosa (figura 13).

Durante a autópsia observou-se que a lesão foi restrita ao sítio de inoculação no peritônio, e que macroscopicamente pareceu ter havido um acúmulo de tecido adiposo de aproximadamente 1,0 mm de diâmetro (figura 13 esquerda). É importante ressaltar que em nenhum momento os animais sofreram uma complicação da lesão que pudesse levar a óbito.

Nos grupos DODAB e DOD/AnB, histologicamente (figura 13, direita), a lesão observada correspondeu a uma resposta inflamatória local aguda com predomínio de monócitos, alguns polimorfonucleares, e aparente dano tissular.

HILGERS & SNIPPE já descreveram um aumento no influxo celular na cavidade peritoneal, após inoculação i.p. de DODAB, processo definido como resposta inflamatória local (HILGERS & SNIPPE, 1992; TSURUTA et al., 1999; CARMONA-RIBEIRO, 2001, 2003).

Uma hipótese para a resposta inflamatória local no sítio da infusão poderia ser a interação dos fragmentos de bicamada com proteínas plasmáticas e membranas com carga oposta, lembrando que o DODAB possui uma carga positiva e as células eucarióticas, assim como algumas proteínas possuem carga negativa, o que favorece este tipo de interação eletrostática (CARVALHO & CARMONA-RIBEIRO, 1998). A hidrofobicidade também é um fator importante, já que muitas células, assim como proteínas tipo albumina, possuem domínios altamente hidrofóbicos que podem reagir com a bicamada do carreador formando-se um complexo de alta afinidade entre o DODAB e as proteínas séricas (CARVALHO & CARMONA-RIBEIRO, 1998).

Vale a pena mencionar que freqüentemente, durante a administração de muitos medicamentos injetáveis, principalmente oleosos, como anticoncepcionais e hormônios de uso intramuscular ou mesmo antibióticos tipo penicilina, produzem-se lesões características no sítio de inoculação, as quais são reabsorvidas gradualmente. Assim, para estes tipos de medicamentos é recomendada uma administração bastante lenta que favoreça a solubilização e absorção, *in vivo*.

Talvez a administração mais controlada de DODAB ou DOD/AnB evitaria a produção da lesão observada, fato difícil de instaurar no modelo animal utilizado.

Finalmente, como observado nos grupos crônicos, a reversão deste tipo de lesão local começa a ser observada no transcurso do tempo. A biodegradação do complexo DODAB proteína e/ou células parece ser lenta.

Fisiologicamente, talvez o único sinal associado ao processo granulomatoso, foi a queda do peso corporal, restabelecido somente após o primeiro mês do término do tratamento (tabela 16, gráfico 5). Já no grupo DOC/AnB, esta queda do peso corporal foi restabelecida dentro do primeiro mês de tratamento, o que pareceu estar mais associado ao *stress* físico produzido pela administração da formulação.

Com relação a administração, como citado anteriormente, a principal desvantagem da formulação DOD/AnB foi relacionada a sua limitada capacidade para carregar a forma monomérica da AnB: 10 mg/mL de fragmentos de bicamada de DODAB solubilizaram uma concentração menor que 0,1 mg/mL de AnB. Assim, teoricamente a instauração de um esquema terapêutico deveria ser bastante prolongado, administrando-se lentamente doses diárias de DOD/AnB durante vários dias, similar a esquemas de hemoterapia ou mesmo formulações de AnB já disponíveis comercialmente (DUPONT, 2002).

5.4.3. Toxicidade aguda versus toxicidade crônica por órgão

Baço

Durante a autopsia, um fato que chamou a atenção foi o aumento no tamanho do baço — esplenomegalia — nos grupos tratados com DODAB incorporando ou não AnB, logo após 10 dias de tratamento.

Neste período, o peso do baço dos animais pertencentes aos grupos DODAB e DOD/AnB foi significativamente maior em relação aos respectivos animais do grupo controle e grupo DOC/AnB ($P < 0,05$, tabela 15), porém, a contagem de células totais esplênicas não mostrou diferença significativa (tabela 21). Uma análise minuciosa focalizada na diferenciação celular esplênica quantitativa (esplenograma), revelou um leve aumento da celularidade, principalmente na linhagem granulocítica, porém este aumento

não foi estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($P > 0,05$).

Na tentativa de explicar a esplenomegalia associada ao uso de DODAB, na etapa aguda de avaliação, foi realizado o estudo histopatológico do baço pela coloração H&E. Após 10 dias de tratamento, as alterações observadas revelaram o espessamento da cápsula esplênica, leve hiperplasia da polpa branca e discreta congestão. Assim ficou evidente que o leve aumento da celularidade, já observada no esplenograma, a congestão e o espessamento da cápsula foram responsáveis pelo aumento do tamanho do órgão, nesta etapa aguda.

Devido ao aumento da cápsula, houve predomínio de células granulocíticas (células inflamatórias), e a inexistência de lesão celular por hipóxia, conduziu-se à hipótese de que a etiologia da congestão é inflamatória e não circulatória, como seria o caso de uma insuficiência cardíaca.

Considerando-se que no processo inflamatório, além do aumento na migração celular, há um aumento do suprimento sanguíneo concomitante para as áreas afetadas, e conseqüente aumento da permeabilidade capilar.

Esta teoria ficou mais evidente quando foi realizado o estudo de toxicidade crônica. Após 6 meses do término do tratamento, a autopsia revelou a reversão da esplenomegalia (tabela 15), porém contrária a toxicidade aguda, onde houve um aumento significativo da celularidade esplênica (tabela 22), principalmente da linhagem linfocítica, em concordância com os achados histológicos. Na histopatologia destes grupos crônicos (figura 13 B), observou-se a presença de infiltrado linfocítico próximo à cápsula esplênica. O aumento da série linfóide e a maturação preservada destas células, garantem que o baço não tenha uma hemopoiese ineficaz. Esta discreta hiperplasia e o aumento da cápsula esplênica, mesmo depois de seis meses, podem ter sido uma conseqüência da interação do anifílico, diretamente com o baço e, indiretamente pela corrente sanguínea.

Revisando a estrutura funcional do baço (figura 16), podemos entender a etiologia das alterações citadas.

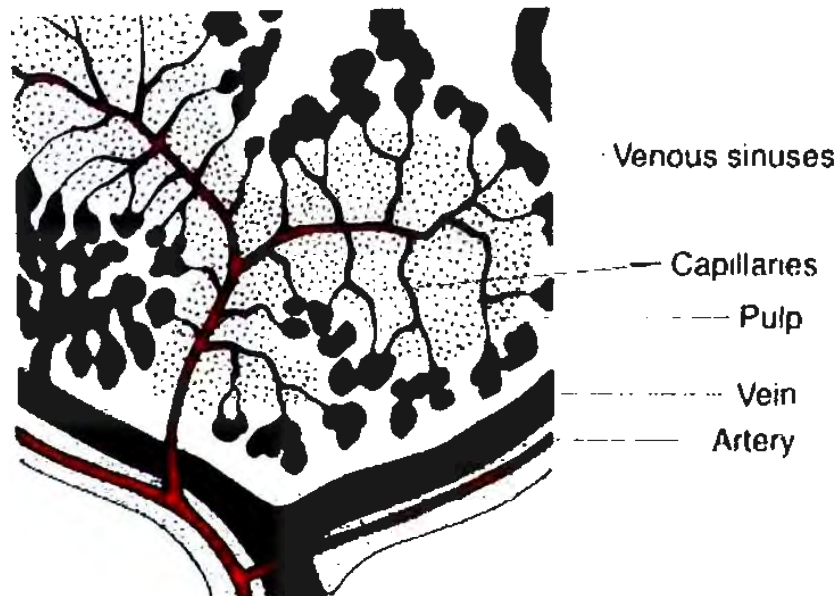


Figura 16. Estrutura funcional do baço. A figura nos mostra um pequeno segmento periférico.

No baço, uma pequena artéria penetra desde a cápsula esplênica até a polpa esplênica, terminando em pequenos capilares. A alta porosidade dos capilares permite a passagem de um grande número de células sanguíneas, desde os capilares, para os cordões esplênicos da polpa vermelha. Estas células são comprimidas gradualmente através de uma espécie de peneira trabecular dos cordões esplênicos, e eventualmente retomam à circulação através das paredes endoteliais dos sinusóides venosos. As trabéculas da polpa vermelha são ocupadas por macrófagos semelhante aos sinusóides venosos do sangue, que fornece à fagocitose de debris celulares, hemácias e, compostos exógenos. Assim, estruturas fagocitadas ou livres, sejam lipossomos, fragmentos de bicamada ou microorganismos que ingressam na circulação geral, obrigatoriamente passaram pelo sistema mononuclear fagocítico do baço. No caso do DODAB e DOD/AnB, sua passagem pelo baço através da artéria trabecular gera uma resposta inflamatória imunoestimulante, caracterizada pela presença de infiltrado mononuclear subjacente e espessamento da cápsula (figura 13, esquerda superior e inferior, A_{x100}, B_{x100}).

A falta de informação sobre este tema na literatura dificulta a completa compreensão da interação do anfilílico com o sistema biológico.

Por outro lado, como descrito por alguns autores, o DODAB têm sido bastante estudado como agente imunoadjuvante. Esta atividade poderia estar associada a um elevado estímulo do sistema imune (HILGERS & SNIPPE, 1992) com subsequente resposta inflamatória no local de inoculação e, aumento da atividade do órgão linfóide secundário como o baço, lembrando que durante um processo imunoestimulador como, por exemplo, uma infecção, este órgão defende o organismo contra os antígenos que têm disseminação hematogênica, fornecendo um ambiente no qual os linfócitos (aumentados na contagem diferencial dos grupos DODAB e DOD/AnB, tabela 22), podem interagir com o agente, neste caso a interação com o DODAB poderia ser o responsável pelo aumento na atividade com a subsequente esplenomegalia.

Uma diminuição na concentração do *carreador* lipídico diminuiria, sem dúvida, a resposta inflamatória esplênica. Fato que deverá ser esclarecido em estudos posteriores.

Fígado

Na análise bioquímica dos grupos de toxicidade aguda, o amplo desvio padrão encontrado na dosagem de enzimas que caracterizam a função hepática, tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados com AnB (tabela 17) pode ser explicada pela etapa de desenvolvimento dos animais. Como descrito na literatura, outros modelos murinos também têm demonstrado uma grande variabilidade (SCHMID & Von FORSTNER, 1986; DERALANKO, 1995), muitas vezes, estabelecendo critérios interpretativos para diferentes etapas de crescimento (segundo a idade do modelo). Por exemplo, citando-se a *fosfatase alcalina*, que tem uma importante participação na formação de tecido ósseo, a sua atividade encontra-se aumentada em vertebrados em crescimento. Assim, o amplo espectro de variação no soro dos animais, nos diferentes tratamentos avaliados, pode ser explicado pelo rápido período de crescimento do modelo murino, mas é importante assinalar que a maioria das formas de doença hepática são acompanhadas por um notório aumento da atividade da fosfatase alcalina no sangue, 5 vezes maior que o valor normal (WINGARD et al., 2000).

As *transaminases (AST e ALT)* são amplamente utilizadas como marcadores da função hepática. Concentrações séricas elevadas são encontradas em hepatites e patologias associadas à necrose hepática como mononucleose infecciosa, cirrose, hepatocarcinoma, e após administração de algumas drogas hepatotóxicas como altas doses prolongadas de acetaminofeno (paracetamol).

Nos casos de distúrbios patológicos, os valores das transaminases encontram-se aumentados 10 vezes sobre os valores de referência (WINGARD et al., 2000).

No presente estudo, em comparação aos animais controle, não houve diferenças estatisticamente significantes nos valores séricos de ambas enzimas ($P > 0,05$), nos regimes terapêuticos utilizados, quando comparados ao controle salino (tabela 17). Porém, surpreendentemente, a análise histológica do fígado em todos os grupos mostrou alterações que corresponderam a um processo inflamatório com áreas degenerativas (hidrópica) localmente extensas. O processo inflamatório foi, na maioria das vezes, perivascular e na etapa aguda correspondeu a um infiltrado polimorfonuclear que foi sendo substituído em função do tempo, por um infiltrado mononuclear.

De forma geral as lesões foram similares, porém um animal do grupo DOD/AnB apresentou hiperplasia/anaplasia de células epiteliais cúbicas dos ductos biliares hepáticos. Neste caso, a alteração foi produzida pelo acúmulo e passagem da AnB pelo ducto biliar, talvez associada a um processo de excreção biliar, como será discutido mais tarde.

A falta de sensibilidade dos marcadores da função hepática nos indica que só haverá um aumento nos níveis séricos de tal marcador, a partir do momento que houver dano celular extenso o bastante que promova a liberação anormal de enzimas específicas produzida pelo órgão, numa quantidade detectável.

Pela falta de correlação dos achados histológicos com os parâmetros bioquímicos, optou-se pelo uso do exame histopatológico na avaliação da cronicidade

Rins

Como citada na introdução, as alterações renais — principal disfunção associada ao uso da AnB — podem ser diagnosticadas laboratorialmente pelo aumento duplo do nível basal de creatinina. Esta alteração é comumente encontrada em terapias que utilizam doses elevadas de AnB (acima de 1,5 mg/kg/dia) por períodos prolongados, principalmente sob formulação com desoxicolato de sódio, esquema terapêutico no qual muitas micoses sistêmicas severas são tratadas (GALLIS et al., 1990).

Um outro marcador utilizado para avaliar a função renal, é a dosagem sérica de uréia.

No presente estudo ambos marcadores não apresentaram níveis séricos que caracterizassem uma disfunção renal, não existindo diferenças significativas em relação ao grupo controle ($P > 0,05$).

Na avaliação histológica, os dados de menor citotoxicidade *in vitro* observados para a formulação DOD/AnB, foram confirmados.

A única alteração observada nos grupos DODAB e DOD/AnB, corresponderam a uma degeneração hidrópica moderada, a qual é reversível, e a presença de um infiltrado inflamatório linfocítico. Esta última alteração só foi observada após 180 dias de avaliação, e foi independente da incorporação de AnB por parte dos fragmentos de bicamada.

A presença deste tipo de infiltrado é uma característica associada à excreção renal de fármacos como aminoglicosídeos e penicilinas (INUI et al., 2000).

No grupo DOC/AnB observou-se precocemente aos 11 dias, um dano tubular renal (degeneração cística), que foi progredindo após 180 dias para um dano glomerular irreversível com a formação de glomeruloescleroses.

Este tipo de lesão histológica produzida pela formulação DOC/AnB tem sido amplamente descrita (REYNOLDS et al., 1963; WERTLAKE et al., 1963; MILLER & BATES, 1969; SOUZA et al., 2000; ADLER-MOORE & PROFFITT, 2002) e têm sido um dos motivos na procura de novas alternativas terapêuticas.

A atenuação na nefrotoxicidade da AnB pela solubilização da droga em emulsões lipídicas ou pela incorporação em lipossomos, tem sido demonstrada (SOUZA et al., 1993; DÓREA et al., 1997; SOUZA et al., 2000), e está sendo confirmada no presente estudo, para lipídeos sintéticos como o DODAB.

5.4.4. Considerações finais da ação do brometo de dioctadecildimetilamônio sobre o tecido hemopoético.

Toxicidade aguda

Não foram encontradas referências na literatura sobre a ação de dioctadecildimetilamônio no tecido hemopoético.

Os resultados obtidos na toxicidade aguda sugerem que o DODAB, independente da associação à AnB, modifica a fisiologia do tecido sanguíneo, não estando ainda claro os mecanismos envolvidos. A análise do mielograma indica hiperplasia do setor granulocítico e hipoplasia do setor eritróide e linfóide (tabela 24). Após 180 dias a hipoplasia eritróide/linfóide regrediu, mantendo-se a hiperplasia granulocítica.

O DODAB *per se* induziu discreta anemia (tabela 19) que reverteu após 180 dias. A concentração de ferro sérico encontra-se reduzida em relação ao grupo controle ($P < 0,05$, tabela 18), porém os valores ora observados ainda estão dentro da faixa de normalidade para camundongos adultos. A concentração diminuída de ferro e ausência de esferócitos afastam, de início, a possibilidade de que esteja ocorrendo hemólise intravascular. No mielograma observamos redução significativa de eritroblastos policromáticos (tabela 22), que pode ser decorrente da perda precoce do núcleo e a liberação de hemácias policromáticas para a circulação.

No setor leucocitário tanto o DODAB como a associação com AnB (DOD/AnB) induziram o aumento no número de leucócitos circulantes (tabela 19) com neutrofilia (tabela 20), fenômeno que poderia explicar a diminuição nos níveis séricos de ferro e talvez as alterações hematológicas associadas.

Em condições normais, o ferro circulante se encontra ligado a proteínas denominadas transferrinas. Um tipo de transferrina descrita é a lactoferrina, a qual pode ser encontrada intracelularmente nas células fagocíticas (neutrófilos) ou nas secreções mucosas. Assim, um processo que culmina em neutrofilia, como numa resposta inflamatória, teoricamente produziria níveis baixos de ferro extracelular (OTTO et al., 1992; LITWIN & CALDERWOOD, 1993). Frente a um processo imunoestimulador como, por exemplo, uma infecção microbiana, a hipoferremia torna-se uma forma de defesa

inespecífica do hospedeiro, por originar um microambiente restrito de ferro, o qual é necessário para a patogênese do processo infeccioso (OTTO et al., 1992; LITWIN & CALDERWOOD, 1993). Esta diminuição do ferro sérico, provavelmente pela neutrofilia, poderia ter afetado diretamente a linhagem eritróide.

Embora na etapa aguda, o número total de células da medula óssea dos animais dos grupos DODAB e DOD/AnB não tenha diferido do controle ($P > 0,05$, tabela 23), poderia ser devido à maior mobilização das células para a circulação, pois o compartimento granulocítico apresentou aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$, tabela 23), sugerindo esta ação estimulatória (ou pró-inflamatória) do lipídeo sintético.

A literatura refere que o DODAB, quando associado a antígenos, possa agir como imunoadjuvante (HILGERS & SNIPPE, 1992; TSURUTA et al., 1999; CARMONA-RIBEIRO, 2001, 2003). Esta ação estimuladora poderia ser a explicação do achado no experimento histopatológico realizado na segunda parte deste estudo quando foi avaliada a atividade *in vivo* da formulação DOD/AnB, no qual, surpreendentemente observou-se uma aparente destruição de elementos fúngicos do tecido renal do animal tratado com DODAB sem droga, de uma forma similar ao uso de AnB (figura 12D inferior $\times 400$). Embora o uso de DODAB sem droga não tenha favorecido a sobrevida dos animais infectados assim como a redução da colonização dos órgãos infectados, a possível ação imunoestimulatória parece ter mostrado um efeito protetor, porém, de forma reduzida, contra a candidíase sistêmica grave induzida no modelo animal.

Por outro lado vesículas ou fragmentos de DODAB apresentam atividade fungicida (CAMPANHÃ et al., 2001), conforme confirmado na avaliação da atividade *in vitro* (tabela 14).

Toxicidade crônica

A análise hematológica, através do hemograma, mostrou uma reversão dos parâmetros que caracterizaram a anemia descrita na etapa aguda.

A contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina e hematócrito (tabela 19) não apresentaram diferenças significativas quando comparado ao grupo controle ($P > 0,05$).

A alteração encontrada foi uma leucocitose moderada onde anteriormente foi três vezes maior que o nível basal (tabela 19). Esta leucocitose moderada coincide com a definição de toxicologia de adaptação.

Este fenômeno de adaptação é uma tentativa de um organismo responder a um estímulo externo constante. Em alguns casos, esta adaptabilidade pode ser benéfica.

Como exemplo de adaptação fisiológica poderíamos citar o aumento de massa muscular em atletas devido ao exercício físico que aumenta a demanda metabólica. Um exemplo de adaptação patológica poderia ser a troca de epitélio colunar para epitélio ciliado escamoso na traquéia e brônquios de fumantes. Assim talvez como consequência do processo inflamatório permanente, os valores na contagem de leucócitos ficaram aumentados.

Observando a tabela 20 podemos deduzir que o aumento foi tanto da linhagem PMN neutrofílica e linfocitária.

Finalmente é interessante mencionar que, contrariamente, o grupo DOC/AnB apresentou uma leve neutropenia em comparação ao grupo controle (tabela 19), o que talvez poderia ter um significado clínico de imunodepressão.

5.4.5. Hipótese sobre a toxicocinética de DODAB e DOD/AnB no modelo murino estudado

1. Absorção dos compostos estudados

Sabe-se que nenhuma partícula inoculada num tecido biológico pode ser absorvida diretamente pelos capilares de membrana para o sangue, exceto quando a via de administração é endovenosa. Quando um agente é administrado via parenteral, este passa através das camadas celulares situando-se no líquido intersticial. Posteriormente ele pode entrar: nas células locais; nos capilares sanguíneos e o sistema circulatório; ou entrar no sistema linfático, sendo que eventualmente podem ocorrer todas as situações mencionadas em diferentes proporções, porém, sempre será ativada a primeira linha de defesa mediada

pelos macrófagos locais presentes no tecido atingido. O tipo e duração da resposta imune desenvolvida vão depender das características do agente administrado assim como da concentração utilizada.

Assim, no caso de DODAB e DOD/AnB, através do estudo histopatológico realizado, pode-se observar que a administração i.p.independente da adição da AnB gerou uma resposta inflamatória local com formação de granuloma (Figura 17).

Sendo o DODAB uma molécula carregada positivamente, num primeiro contato com as células do local de inoculação, há uma atração eletrostática que focaliza o agente no local da administração. Esta interação afeta a transferência passiva da AnB para os capilares e/ou linfáticos gerando um processo inflamatório local. Na absorção do carreador, DOD/AnB ou a AnB livre, a cabeça polar catiônica do carreador interage com a membrana de células fagocíticas (promovendo o processo de endocitose) as quais são recrutadas pela liberação de mediadores quimiotáticos, produtos do processo inflamatório estabelecido (figura 17). As partículas suspensas no meio extracelular podem ser engolfadas, quebradas e, transportadas no interior das diferentes células envolvidas em cada etapa do processo inflamatório, ou absorvidas pelo capilar de membrana e/ou linfático adjacente, como esquematizado nas figuras 17, 19 – 21.

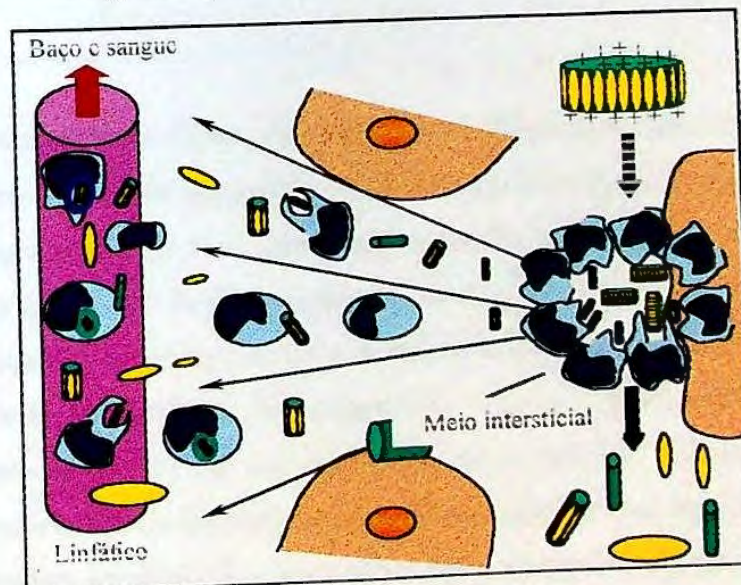


Figura 17. Macrófagos intraperitoneais: Primeira linha de defesa. Absorção de DODAB, DOD/AnB ou AnB para o linfático e distribuição para o baço e sistema circulatório. (Adaptado, GUYTON, 1992).

No caso da figura 17, neste tipo de absorção os agentes ingressam ao sistema circulatório através dos linfáticos (figura 18). Este transporte é mais lento além de que só uma pequena proporção dos agentes pode ser transportada via linfa (um décimo da absorção), em contraste com a via capilar.

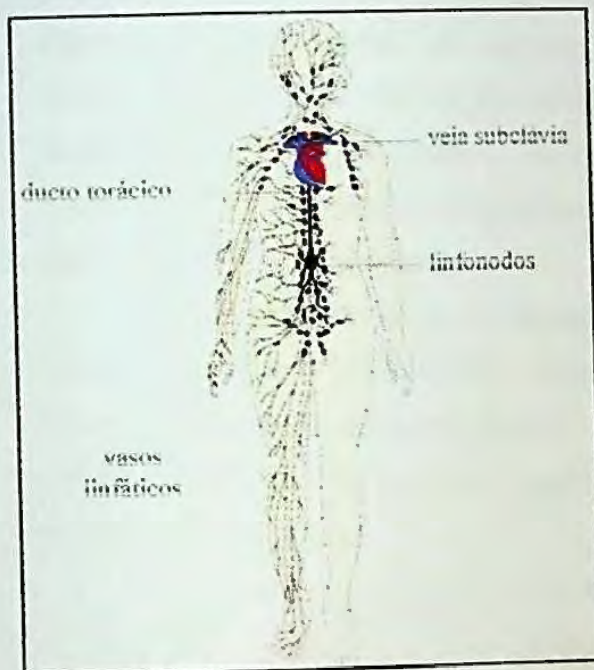


Figura 18. Os linfonodos são encontrados nas junções dos vasos linfáticos e formam uma rede completa que drena e filtra os fluidos derivados do sangue nos espaços teciduais. Os linfonodos podem ser superficiais ou viscerais, fazendo a drenagem dos tecidos e órgãos internos do corpo. A linfa que atinge o ducto torácico drena para a veia subclávia esquerda e, então entra na circulação sanguínea. (Adaptado, GUYTON, 1992).

Adicionalmente o baço, principal órgão linfóide conectado com a circulação geral, será ativado — fato este que poderá explicar a esplenomegalia descrita na etapa aguda. A histopatologia esplênica fundamenta esta hipótese. Na figura 13 A (direita) pode ser observada a reatividade do órgão independente do carreador, hiperplasia de polpa branca e discreta congestão esplênica com sítios linfóides reativos. O espessamento da cápsula assim como o resto das observações sugere um processo inflamatório do órgão, como consequência da distribuição dos agentes estudados pela via linfática e hematogênica. Os linfáticos podem transportar proteínas e partículas grandes para fora do espaço tissular, os quais não podem ser absorvidos diretamente dentro do capilar sanguíneo.

Como discutido anteriormente, a atividade imunoestimulante de DODAB já tem sido estudada, porém, estudos histopatológicos assim como a avaliação hematológica do fenômeno, ainda não tem sido descritas.

Para argumentar a segunda hipótese de absorção, consideraremos a segunda linha de defesa constituída por neutrófilos e monócitos que atacam e destroem um agente externo. Os neutrófilos são células maduras que podem realizar esta função diretamente no sistema circulatório. Pelo contrário, os monócitos são células imaturas que têm pouca habilidade para realizar esta função defensiva, porém, quando entram no tecido, sofrem uma maturação para um estágio imunologicamente mais competitivo sendo classificados agora como macrófagos, capazes de combater agentes invasores. Tanto neutrófilos como macrófagos mobilizam-se através dos tecidos por movimentos amebóides, muitas vezes em resposta a estímulos quimiotáticos. Assim, quando um tecido chega a ser inflamado, diferentes produtos quimiotáticos serão formados, estimulando a mobilização destas células especializadas para a área afetada.

A mais importante função de neutrófilos e macrófagos é a fagocitose. Os neutrófilos ingressam no tecido lesado e se unem às partículas projetando pseudópodos ao redor delas, promovendo a fusão destas estruturas e subsequente o engolfamento da partícula em questão. Posteriormente a partícula invaginada forma uma vesícula fagocítica ou fagossoma no interior do citoplasma.

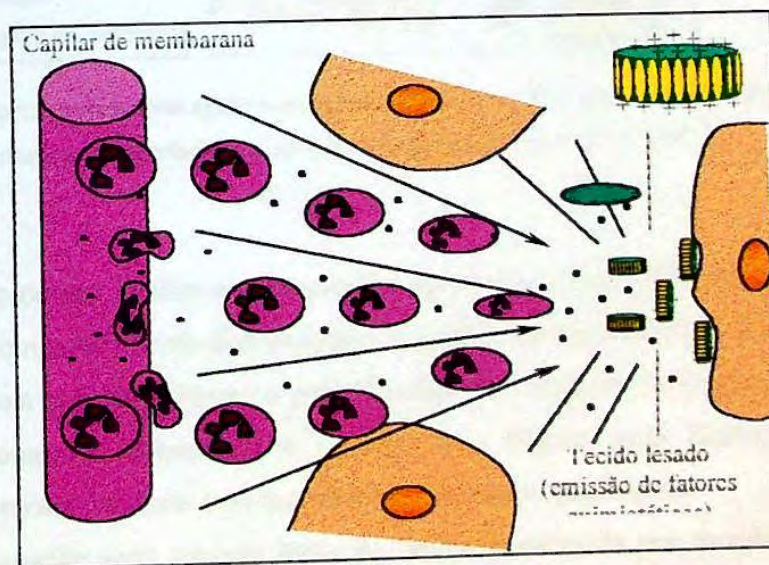


Figura 19. Invasão de neutrófilos na área inflamada: Segunda linha de defesa. (Adaptado, GUYTON, 1992).

A neutrofilia absoluta, periférica e medular, observada na avaliação hematológica (tabela 20, 24) dos grupos DODAB e DOD/AnB, sustentam esta segunda hipótese. A reação inflamatória aguda produzida no local da inoculação estimula a proliferação e mobilização destes PMN desde a medula óssea para a circulação com posterior chegada no sítio de inoculação, já nas primeiras horas após do início do processo inflamatório (figura 20).

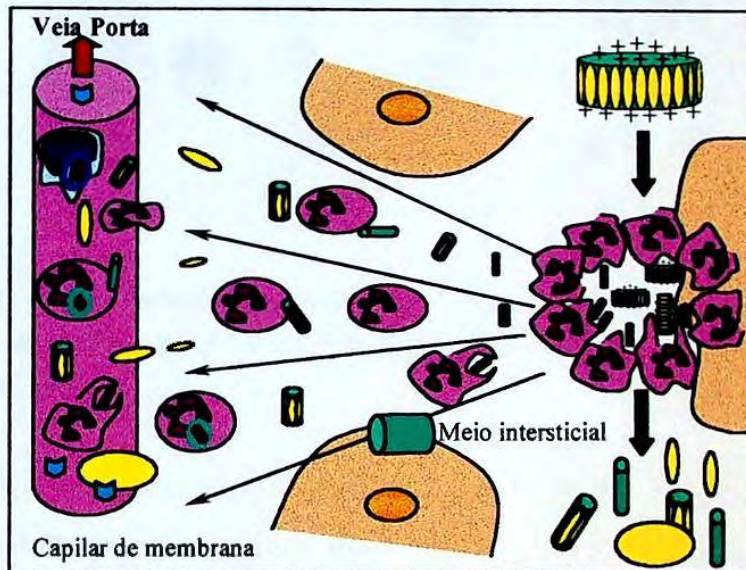


Figura 20. Resposta inflamatória aguda mediada por PMN neutrófilo. Absorção de DODAB, DOD/AnB ou AnB para o sistema porta e distribuição para o fígado. (Adaptado, GUYTON, 1992).

Este processo facilita a absorção dos agentes estudados para os capilares venosos adjacentes, com subsequente distribuição pelo sistema porta-hepático, pela degradação dos complexos seja pela fagocitose ou pela liberação de enzimas. Infelizmente os leucócitos podem prolongar a inflamação e induzir dano tissular pela liberação de enzimas lisossomais, prostaglandinas e ou leucotrienos, formando granulomas.

Tardiamente uma terceira linha de defesa constituída por monócitos/macrófagos origina-se do mesmo modo que no caso anterior. Os monócitos são células que se encontram em menor proporção, em comparação com os PMN, assim o acúmulo de monócitos na área inflamada é mais lento. Só após vários dias e semanas há um predomínio dos macrófagos (figura 21).

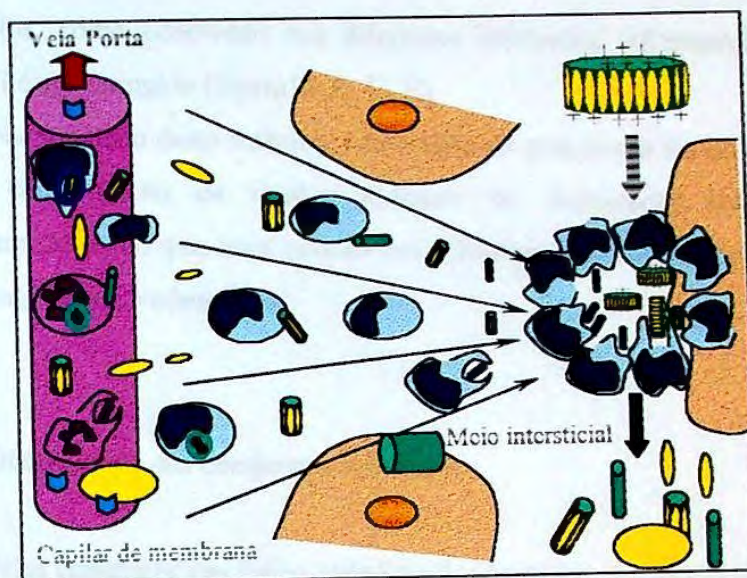


Figura 21. Resposta inflamatória crônica. Chegada e predomínio de monócitos/macrófagos na área lesada e absorção de DODAB, DOD/AnB ou AnB para o sistema porta e distribuição para o fígado (Adaptado, GUYTON, 1992).

No caso de persistir a inflamação, o predomínio deste tipo de infiltrado celular é acompanhado pela formação de tecido conectivo, processo conhecido como fibrose. Estes últimos acontecimentos caracterizam a inflamação crônica (ROBBINS et al., 1994).

Finalmente, tanto para a absorção via linfática como para a absorção via veia porta, há uma liberação controlada da droga quando se utiliza o DODAB como carreador. Este fato pode ser argumentado pela diferença das lesões comparadas ao DOC/AnB. Como pode ser observado nas figuras 14 F (superior e inferior) o uso de DOC/AnB (liberação não controlada) apresentou lesões localmente extensas (hepatócito) de necrose sem infiltrado inflamatório e, uma hemorragia intensa. Este fato pode sugerir que a ação da droga na formulação DOC/AnB foi mais rápida, o que poderá ser explicado nos testes de biodistribuição da droga. Usando DODAB a droga pode ser liberada como monômeros de AnB o que facilita a solubilidade e toxicidade no sistema. Como foi apresentado, o efeito citotóxico no rim foi menor quando comparado a DOC/AnB (gráfico 4, figura 15 C e D).

Independente da associação com AnB, na concentração utilizada, DODAB é um agente pró-inflamatório que estimula principalmente a proliferação de leucócitos PMN

neutrófilos, como observado nos diferentes infiltrados inflamatórios sendo o fígado o principal órgão atingido (figura 14, C, D, E).

Na condição deste trabalho a formação do granuloma foi difícil de ser evitado pela grande concentração de lipídeo utilizado na formulação (oleosa) e pela rápida administração sendo que, uma infusão lenta facilitaria a solubilidade e a absorção da droga, diminuindo talvez o efeito local.

5.4.6. Distribuição dos compostos estudados

Pelas características físico-químicas do carreador, anfifílico sintético, o *clearance* da AnB no sangue pode estar associada ao engolfamento de fragmentos, ou parte dos fragmentos, por células fagocíticas (SCHERPHOF et al., 1983; MOGHIMI & HUNTER, 2001; MOGHIMI ET AL., 2001) ou, ligação a proteínas como albumina ou α 1-glicoproteína (MEIJER & Van Der SLUIJS, 1989; BEKERSKY, 2002). Do mesmo modo a albumina livre circulante também pode estar associada a estas proteínas, mas a literatura descreve que há aumento da ligação a lipoproteínas pela maior afinidade, por parte da AnB, pelo colesterol transportado nestas lipoproteínas (BARWICZ et al., 2002). Alguns autores sugerem que as proteínas têm uma afinidade 100 vezes menor em comparação as lipoproteínas (BRAJTBURG et al., 1984).

De modo geral, o transporte protéico atenua a toxicidade da droga pelo aumento da solubilidade e diminuição do estado de agregação da droga (ARAMWIT et al., 2000). Embora Janina Brajtburg e colaboradores tenham observado maior toxicidade da AnB quando associada a LDL, onde 4 - 10 moléculas de colesterol associam-se a uma molécula de AnB (BRAJTBURG et al., 1984), há menor toxicidade quando a AnB é transportada pela HDL.

No caso de DODAB é mais provável que a ligação seja principalmente por proteínas com carga oposta como a α 1-glicoproteína, além, (CARVALHO & CARMONA-RIBEIRO, 1998) provavelmente das células fagocíticas.

Independente do transporte, após a absorção dos compostos estudados pelas diferentes vias analisadas, na avaliação histopatológica subaguda do modelo murino

podemos observar uma lesão hepática por parte de DODAB, DOD/AnB e DOC/AnB (figuras 14: C, D, E, F, G).

O fígado dos grupos tratados com DODAB apresentou uma lesão inflamatória (14: B, C) enquanto que no grupo DOD/AnB esta lesão foi adicionalmente uma lesão de ducto biliar e de hepatócitos (figura 14: D inferior) sugerindo que a AnB teve uma interação celular independente do carreador. Em ambos os grupos a lesão em geral, caracteriza um processo degenerativo inflamatório com predomínio de infiltrados PMN neutrófilos (figura 14: C, D, E, F), fato este associado à neutrofilia periférica e medular observada no hemograma.

Em geral os ductos biliares são freqüentemente danificados em casos de doença hepática geral, como hepatite viral e toxicidade gerada por algumas drogas.

A formação da bile tem principalmente duas funções: emulsificar os ácidos graxos da dieta no intestino a partir dos sais biliares e; eliminar impurezas. A bile é a primeira via de eliminação de bilirrubina, excesso de colesterol e xenobióticos, produtos os quais são insolúveis para serem eliminados na urina. Esta sofisticada função é rapidamente afetada.

Além do *clearence* pelo sistema mononuclear fagocítico (MOGHIMI ET AL., 2001; SCHERPHOF et al., 1983), pelos resultados aqui apresentados, provavelmente há uma grande atração da AnB, complexada e não complexada ao DODAB, pelas proteínas plasmáticas e/ou à lipoproteína HDL. Este fenômeno aumentaria a dissociação da AnB em nível dos hepatócitos, os quais excretariam a droga diretamente nos canalículos bilíferos, para os ductos de Hering (figura 22 B), desembocando no ducto biliar do espaço porta (figura 14 D inferior, figura 22 A). Este *clearence* favoreceria o dano repetitivo do epitélio cúbico que reveste os túbulos, produzindo um aumento no número de células ou "hiperplasia". A anaplasia está relacionada à falta de diferenciação celular e é considerada uma marca de transformação maligna.

Nos grupos crônicos esta lesão do ducto biliar não foi observada novamente.

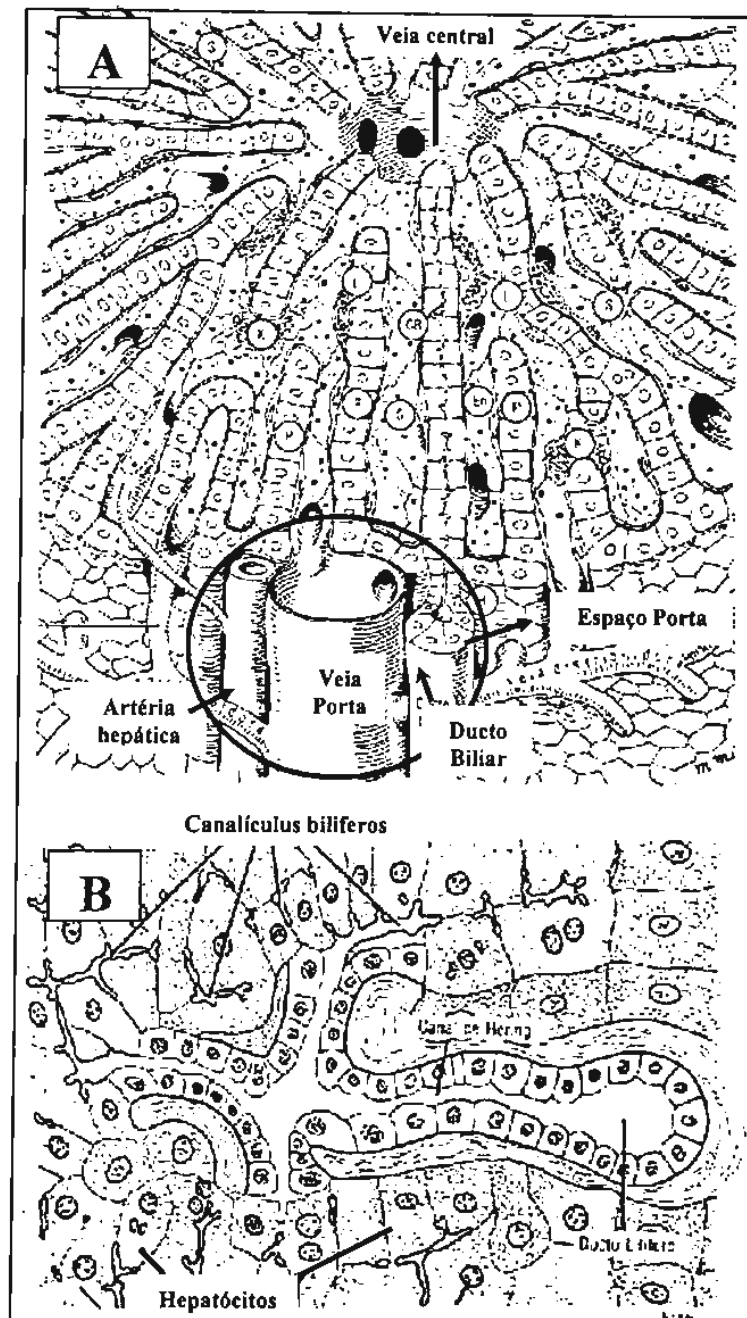


Figura 22. (A), Esquema tridimensional da estrutura do fígado. CB, canaliculo biliar; P, parede de hepatócitos; H, ducto biliar; H, ducto de Hering; K, célula de Kupfer; L, célula armazenadora de lipídeos; S, sinusóides; Em, célula endotelial do sinusóide; Espaço porta formado por veia , artéria e ducto biliar. (B), passagem dos canaliculos bilíferos para os ductos de Hering revestidos por epitélio cúbico. Este desemboca no espaço porta (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Ao contrário, o grupo DOC/AnB histopatologicamente apresentou áreas de degeneração e necrose coagulativa moderada centrolobular, sendo que algumas áreas mostraram indefinição do parênquima, produto de uma necrose intensa e, uma intensa hemorragia. Como discutido anteriormente, estes fatos sustentam a hipótese de que há uma liberação controlada da droga quando se utiliza o DODAB como carreador, porém há uma maior excreção biliar quando comparada ao DOC/AnB, cuja ação é mais rápida e devastadora.

5.4.7. Excreção renal de DODAB, DOD/AmB e DOC/AmB

O rim é um dos principais órgãos envolvidos na excreção de drogas, seus metabólitos, e xenobióticos, através da eliminação de substâncias pela urina. A unidade funcional responsável pela excreção é o néfron, sendo que cada rim contém ao redor de um milhão de néfrons. No néfron, três regiões que participam do processo de excreção podem ser reconhecidas: o glomérulo, o túbulo proximal, e o túbulo distal (figura 23).

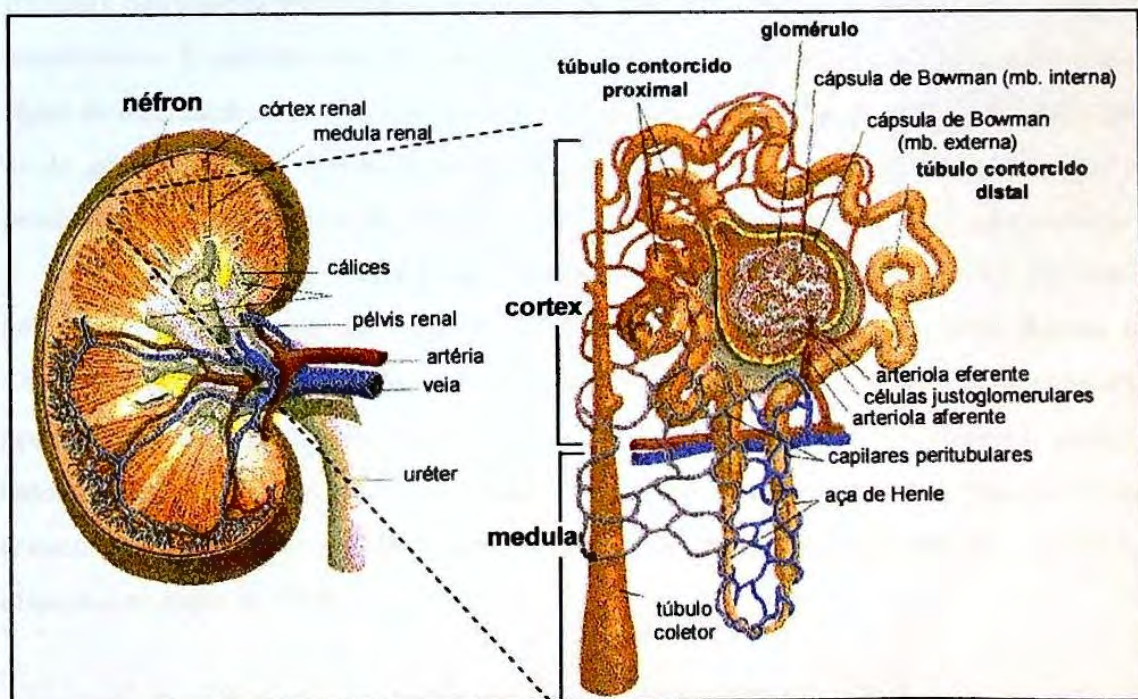


Figura 23. Esquema representativo da estrutura dos néfrons com seus túbulos e glomérulos dispostos na cortex renal. A excreção renal pode ser realizada como secreção tubular ou filtração glomerular, dependendo da natureza química do composto (IUPAC, 1993).

Na excreção urinária há envolvimento de três processos podem estar envolvidos: a filtração, a secreção, e a reabsorção.

1) A filtração, o primeiro processo, é levado a cabo no glomérulo, uma região vascularizada no começo do néfron. Uma considerável quantidade do plasma sanguíneo é filtrada através dos glomérulos em direção aos túbulos renais como um resultado da grande quantidade de sangue que flui pelos glomérulos, a abundante quantidade de poros nos capilares glomerulares (40 Å), e a pressão hidrostática do sangue.

Pequenas moléculas, incluindo água, passam através de uma espécie de filtro disposto como uma peneira na área glomerular. Do mesmo modo, substâncias polares e lipídeos solúveis seguem o mesmo curso.

2) A secreção ocorre em nível do túbulo proximal do néfron e é responsável pelo transporte de certas moléculas, do sangue para a urina, independente do processo de filtração. Substâncias secretadas incluem íons de potássio, hidrogênio, antibióticos, e alguns xenobióticos. O processo de secreção ocorre por um mecanismo de transporte ativo que é capaz de diferenciar entre diferentes compostos baseado na polaridade e hidrofobicidade. De modo geral existe um sistema de transporte de ácidos fracos, como drogas conjugadas e penicilinas, e um outro sistema que transporta substâncias básicas como histamina e colina.

3) A reabsorção é realizada principalmente em nível do túbulo contorcido proximal do néfron. Grande parte da água, glicose, potássio, e aminoácidos perdidos durante a filtração glomerular re-ingressam ao sangue a partir dos túbulos renais, num caminho oposto ao da secreção tubular. O processo ocorre primariamente pela transferência passiva baseada sob um gradiente de concentração, movimentando-se desde uma área de maior concentração no túbulo proximal, para uma área de menor concentração, nos capilares dispostos ao redor do túbulo.

Um fator fisiológico que deve ser considerado, quando se fala de excreção, é a ligação de uma droga a proteínas plasmática. Como em condições normais não é possível a

filtragem de proteínas através dos glomérulos, a única via alternativa para a eliminação de drogas ligadas a proteínas é a secreção tubular.

Considerando-se estas definições preliminares podemos interpretar os achados dos estudos histopatológico, hematológicos, bioquímicos, e da análise de sobrevida discutida anteriormente.

Primeiramente, parece que a liberação controlada de DOD/AnB condiciona uma situação na qual baixas concentrações de AnB atingem o rim por um período prolongado, o que justificaria a maior sobrevida no modelo murino de candidíase sistêmica quando comparado ao tratamento com DOC/AnB (LINCOPAN et al, 2003). De fato, esta excreção urinária contribuiria na chegada e ação da droga em nível renal. Isto fica evidente quando são avaliados os cortes histopatológico dos animais tratados. Como observado nas figuras 15 B, independente da incorporação da droga, alterações significantes no tecido renal associado ao uso de DODAB só puderam ser confirmadas após o sexto mês de avaliação. Tanto os grupos DODAB e DOD/AnB apresentaram infiltrados linfocíticos na área cortical renal, diferente do grupo DOC/AnB no qual rapidamente (após os 10 dias de tratamento) pode-se observar lesões tubulares degenerativas císticas com conteúdo hemorrágico. Lesões estas que após 6 meses estenderam-se comprometendo os glomérulos com a formação de glomeruloesclerose e presença de cilindros hialinos, em alguns casos. A rápida excreção da AnB veiculada em desoxicolato produz um dano progressivo irreversível, a partir destas lesões glomerulares e tubulares, podendo diferenciar o dano ascendente que se estende desde o túbulo proximal até o glomérulo.

No caso do DODAB uma molécula hidrofóbica e catiônica, teoricamente, teria a sua excreção exclusivamente pelo processo de secreção tubular a partir de proteínas específicas (Glicoproteína-P) (INUI et al., 2001), correspondendo ao tipo de lesão estabelecido, infiltrado inflamatório intersticial, processo idêntico ao da AnB. O seja DODAB e DOD/AnB sofrem eliminação a partir da secreção tubular e não através da filtração glomerular.

Do ponto de vista histopatológico DOD/AnB é menos nocivo que DOC/AnB.

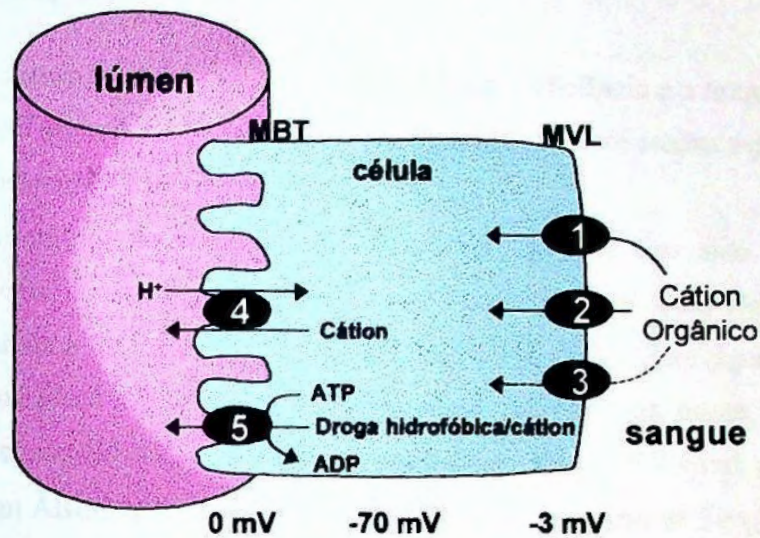


Figura 24. Mecanismos de secreção tubular para compostos catiônicos e hidrofóbicos. A captura deste tipo de compostos pela célula tubular renal, através da membrana vasolateral (MVL), é mediada por transportadores dependentes da diferença de potencial. (1) *organic cation transporters*: 1, OCT1; 2, OCT-2; 3, OCT-3. A saída para o lúmen tubular é mediada por uma não identificada anti-porta (4) dependente da gradiente de prótons. A Glicoproteína-P (5) está envolvida na secreção de drogas hidrofóbicas e catiônicas. (INUI, et al., 2000)

5.4.8. Considerações finais

O uso seguro da AnB é um compromisso entre a eficiência e a toxicidade, assim, a formulação ideal poderia ser definida como aquela na qual a dose efetiva seja tão baixa que impeça o estabelecimento da toxicidade.

Uma vantagem do emprego de carreadores lipídicos tem sido a redução da toxicidade e, uma desvantagem tem sido o uso de doses muito mais elevadas de AnB quando comparada a formulação convencional (DUPONT, 2002). Para alguns autores, esta redução da toxicidade em relação ao uso de doses elevadas da droga, não tem sido suficientemente demonstrada. Em estudos comparativos, SHARKEY e col. reportaram que tratamentos com ABLC (complexo lipídico Abelcet®) na dosagem de 5 mg/kg/dia e, AnB convencional 0,7 mg/kg/dia, no tratamento de pacientes HIV positivo com meningite criptocócica, tiveram o mesmo efeito nefrotóxico no aumento dos níveis de creatinina (SHARKEY et al., 1996). Por outro lado, Wingard e col. reportaram uma incidência de nefrotoxicidade de 42% associado ao uso do complexo lipídico ABLC e, 15% associado à AnB lipossomal, na dosagem de 5 mg/kg/dia no tratamento empírico de pacientes neutropênicos com episódios febris (WINGARD et al., 2000). Resultados similares têm sido reportados por WALSH e col. (19% de toxicidade na mesma dosagem de AnB lipossomal) (WALSH et al., 1999). Assim parece ser que, pelo menos no caso do complexo lipídico ABLC, a toxicidade sempre estará associada ao uso de grandes doses de AnB, longe da formulação ideal. Nos casos anteriores, ABLC apresentou idêntica nefrotoxicidade que DOC/AnB, quando administrada na dose aprovada pela FDA (*US Food and Drug Administration*, 5 mg/kg/dia). Portanto espera-se que o uso de doses menores de AnB sejam menos nefrotóxicas, fato mostrado no presente estudo (gráfico 4, figuras 15 C -15 D).

Os dados aqui apresentados são resultantes dos primeiros ensaios de atividade e toxicidade associados ao uso, *in vivo*, de DODAB e DOD/AnB, descritos na literatura. A inexistência de outros estudos toxicológicos semelhantes dificultou a comparação de nossos resultados. Procurou-se assim, de alguma forma, contribuir para iniciar a compreensão dos mecanismos pelos quais este tipo de carreadores interagem com o sistema biológico.

Há, sem dúvida, necessidade da complementação deste trabalho com estudos farmacocinéticos que nos permitam conhecer a biodisponibilidade do complexo DOD/AnB, para melhor compreensão da interação deste tipo de carreador com o sistema biológico.

Com o completo esclarecimento da interação deste carreador com o sistema biológico, outros horizontes poderão se abrir com dezenas de aplicações na área da saúde humana.

6. Conclusões

Os resultados alcançados com a metodologia empregada permitiram concluir que:

1. Nanofragmentos de bicamada de DODAB obtidos por sonicação com tip ofereceram ótimos sítios de solubilização para a anfotericina B.
2. Uma concentração de 10 mg de DODAB por mL foi capaz de solubilizar uma concentração $\leq 0,1$ mg de anfotericina B, em ausência de solventes orgânicos.
3. A anfotericina B solubilizada no nanofragmento de DODAB apresenta um predomínio de formas monoméricas, com um espectro de absorção UV-visível idêntico ao obtido pelo solvente orgânico ideal (DMSO:Metanol 1:1).
4. DOD/AnB foi coloidalmente mais estável que o Fungizon® (DOC/AnB), na temperatura ambiente de armazenamento.
5. DOD/AnB mostrou atividade fungicida *in vitro* sobre espécies de *Candida albicans*. Para *C. albicans* ATCC 90028 a CFM da formulação DOD/AnB foi $\geq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ e, para a espécie patogênica HU168 a CFM foi $\geq 0,250$ $\mu\text{g/mL}$.
6. DOD/AnB e Fungizon® mostraram a mesma eficiência no tratamento da candidíase sistêmica ($P > 0,05$).
7. Houve sobrevida de 100% dos camundongos infetados com 10^5 UFC de *C. albicans* HU168, quando tratados com uma dose de 0,4 mg/kg/dia administrada i. p. x 10 dias consecutivos, versus uma sobrevida de 70% para DOC/AnB, na mesma condição.

8. O uso de nanofragmentos de bicamada de DODAB, independente da incorporação da AnB, esteve associado ao aparecimento de uma lesão inflamatória aguda granulomatosa, no local da inoculação, e uma esplenomegalia, ambas reversíveis após 180 dias.
9. DOD/AnB, DOC/AnB e DODAB provocaram uma diminuição de peso nos animais após a administração i.p., alteração esta que foi reversível após o décimo e trigésimo dia de inoculação de DOC/AnB e DODAB ou DOD/AnB, respectivamente.
10. O uso de nanofragmentos de bicamada de DODAB não provocou alteração das funções hepática e renal no modelo animal utilizado, quando comparado ao grupo controle ($P > 0,05$).
11. No fígado, as alterações histológicas produzida por ambas formulações foram equivalentes, correspondendo a uma lesões degenerativas com presença de infiltrados inflamatório, neutrofílicos na etapa aguda, e linfocíticos na etapa crônica.
12. No baço, o uso de DODAB com e sem droga, esteve associado a uma esplenomegalia aguda, reversível após 180 dias, como consequência da congestão moderada em resposta a um processo inflamatório.
13. Na etapa crônica houve uma hiperplasia esplênica em todos os tratamentos utilizados.
14. DOD/AnB produz menor nefrotoxicidade, *in vitro* e *in vivo*, em comparação à formulação DOC/AnB, associada a dano tubular e glomerular irreversível.
15. No sangue periférico, o uso de DODAB originou uma redução na contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e concentração de ferro, porém os valores reverteram após 180 dias. Adicionalmente houve leucocitose com aumento diferencial da série neutrofílica, mantida por mais de 180 dias.

16. A neutrofilia associada ao uso de DODAB ou DOD/AnB pode ser o responsável pela hipoferremia e alterações hematológicas associadas.
17. Após 180 dias, o grupo DOC/AnB apresentou uma neutropênia absoluta estatisticamente significativa quando comparado ao controle ($P < 0,05$).
18. Na medula óssea os grupos DODAB e DOD/AnB apresentaram uma hiperplasia mielóide aguda e uma hipoplasia linfóide/eritróide aguda. No estudo crônico, tanto DOD/AnB como DOC/AnB, apresentaram uma hiperplasia linfóide.
19. Para DOD/AnB as alterações observadas foram fígado > baço > rim, e para DOC/AnB rim > fígado > baço.
20. Dentre das vantagens associadas ao uso de DOD/AnB, observadas no presente estudo, destacam-se: o baixo custo; a facilidade de manipulação; a estabilização da AnB na sua forma monomérica; a ausência de solventes; a eficiência equivalente ao Fungizon®; a menor nefrotoxicidade, e dentre das desvantagens destacam-se: a alta concentração de anfifílico; a baixa solubilização de AnB; a instabilidade coloidal do anfifílico; a formação de granuloma local; o efeito pró-inflamatório; e o efeito imunoestimulante,

7. Referências Bibliográficas[★]

ADLER-MOORE, J.; PROFFITT, R. Ambisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.49 Suppl. 1, p.21-30. 2002.

ALLINGER, N. L. et al. *Química Orgânica*. 2^a ed., São Paulo, Guanabara. 1978.

ANDREOLI, T. E. On the anatomy of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Kidney Int.*, v.4, p.337-345. 1973.

ARAMWIT, P. et al. The effect of serum albumin on the aggregation state and toxicity of amphotericin B. *J Pharm Sci.*, v.89, p.1589-93. 2000.

BAECHTEL, F. S.; PRAGER, M. D. Interaction of antigens with dimethyl-dioctdecyl-ammonium-bromide, a chemically defined biological response modifier. *Cancer Res.*, 42:4959-4963. 1982.

BAGATOLLI, L.A.; GRATTON, E. A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: A two-photon fluorescence microscopy study. *Biophys. J.*, v.79, p.434-447. 2000.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, v.13, p.238-252. 1965.

BARWICZ, J.; CHRISTIAN, S.; GRUDA, I. Effects of the aggregation state of Amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrob. Agent Chemother.*, v.36, p.2310-2315. 1992.

BARWICZ, J.; BEAUREGARD, M.; TANCRÉDE, P. Circular dichroism study of interaction of fungizone or Ambisome forms of amphotericin B with human low density lipoproteins. *Biopolymers.*, v.67, p.49-55. 2002.

BATZRI, S.; KORN, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication **Biochim. Biophys. Acta.**, v.298, p.1015-1019. 1973.

BECK-SAQUE, C. M.; JARVIS, W. R. The national nosocomial infections surveillance system. Secular trend in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the united states, 1980-1989. **J. Infect. Dis.**, v.167, p.1247-1251. 1993.

BEKERSKY, I. et al. Lipid-based amphotericin B formulations: from animal to man. **PSTT.**, v.2, p.230-236. 1999.

BEKERSKY, I. et al. Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B after administration of intravenous liposomal amphotericin B deoxycholate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, p.834-840. 2002.

BENATTI, C. R. et al. Phase behavior of synthetic amphiphile vesicles investigated by calorimetry and fluorescence methods. **Thermochim. Acta.**, v.328, p.137-142. 1999.

BEN-JOSEF, A. M. et al. In vitro antifungal activity of CAN-296: a naturally occurring complex carbohydrate. **J. Antibiot.**, v.50, p.937-943. 1997.

BENSON, J.M.; NAHATA, M.C. Clinical use of systemic antifungal agents. **Clin. Pharmacy**, v.7, p.424 - 438. 1988.

BODEY, G. et al. Fungal infection in cancer patients: an international autopsy survey. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.11, p.99-109. 1992.

BODEY, G. P. **Candidiasis pathogenesis, diagnosis and treatment**. 2nd ed., New York., Raven Press Ltd, 1993. In Bodey, G.P. (Ed.): **Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment** . Raven Press, Ltd. 1993.

BOLARD, J.; LEGRAND, P.; HEITZ, F.; CYBULSKA, B. One-sided action of Amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. **Biochemistry.**, v.30, p.5707-5715. 1991.

BRAJTBURG, J. et al. Interaction of plasma protein and lipoproteins with amphotericin B. **J. Infect. Dis.**, v.149, p.986-997. 1984.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: Effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutrition Research.**, v.15, p.1477-1485. 1995.

BORELLI, P.; NARDINELLI, L. Protein-calorie malnutrition: decrease in the peritoneal macrophage's. **Braz. J. Pharma. Sci.**, v.37, p.51-60. 2001.

BORGERS, M. Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. **Rev. Infect. Dis.**, v.2, p. 520-534. 1980.

BODEY, G.P. Azole antifungal agents. **Clin. Infect. Dis.**, 14 (suppl.1): p.161 – 169. 1992.

BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, p.512-531. 1996.

CAMPANHÃ, M.T.N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. **J. Lipid Res.**, v.40, p.1495-1500. 1999.

CAMPANHÃ, M.T.N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interaction between cationic vesicles and *Candida albicans*. **J. Phys. Chem.**, v.105, p.8230-8236. 2001.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.733, p.172-179. 1983.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; YOSHIDA, L. S.; CHAIMOVICH, H. Salt effects on dioctadecyldimethylammonium chloride or dihexadecyl phosphate vesicles **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.16, p.563-563. 1983b.

CARMONA-RIBEIRO, A. M. et al. Permeabilities and stabilities of large dihexadecylphosphate and dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles. **J. Colloid Interface Sci.**, v.100, p.433-443. 1984.

CARMONA-RIBEIRO, A. M. et al. Bilayer structure and stability in dihexadecylphosphate dispersions. **J. Phys. Chem.**, v.95, p.5361-5366. 1991.

- CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic amphiphile vesicles. *Chem. Soc. Rev.*, v.21, p.209-214. 1992.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M.; MIDMORE, B.R. Surface potencial in charged synthetic amphiphile vesicle. *J. Phys. Chem.*, v.96, p.3542-3547. 1992.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M. et al. Interactions between cationic vesicles and cultured mammalian cells. *Langmuir*, v.13, p.2215-2218. 1997.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and drugs or biomolecules. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v.72, p.39-43. 2000.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bilayer vesicles and liposomes as interface agents. *Chem. Soc. Rev.*, v.30, p.241-277. 2001.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M. *Interaction between bilayer vesicles, biomolecules and interfaces*, in *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials*, ed. H. S. Nalwa, Academic Press, San Diego, V.5: Biomolecules, Biointerfaces, and Applications, p. 129-165. 2001.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M. Bilayer-forming synthetic lipids: drugs or carriers?. *Curr. Med. Chem.*, v.10, p.2425-2446. 2003.
- CARRIGAN, H. C.; HANF-KRISTUFEK, L. Comparison of nephrotoxicity of amphotericin B products. *Clin Infect Dis.*, v.32, p.990-991. 2001.
- CARVALHO, L. A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Intercation between cationic vesicles and serum proteins. *Langmuir*, v.14, p.6077-6081. 1998.
- CHEN, Y. et al. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981-1993. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v.18, p.369-375. 1997.
- CIAPETTI, G. et al. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials.*, v.17, p.1259-1264. 1996.

- CLARK, J. M. et al. Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.35, p.615-621. 1991.
- COLOMBO, A. L. et al. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microb. Infect. Disease.**, v.34, p.281-286. 1999.
- COLOMBO, A. L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.4, p.113-118. 2000.
- COLOMBO, A. L. **Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. e para sua abordagem terapêutica.** 2003. Dissertação de Tese de livre-docência Universidade Federal de São Paulo São Paulo.
- DASCHER, C. C. et al. Immunization with a mycobacterial lipid vaccine improves pulmonary pathology in the guinea pig model of tuberculosis. **Int. Immunol.**, v.15, p.:915-925. 2003.
- DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.49, p.37-41. 2002.
- DERELANKO, M. J.; HOLLINGER, M. A. **CRC Handbook of toxicology.** CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo. 1995.
- DÓREA, E. L. et al. Nephrotoxicity of amphotericin B is attenuated by solubilizing with lipid emulsion. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.8, p.1415-1422. 1997.
- DROUHET, E.; DUPONT, B. Evolution of antifungal agents - past, present, and future. **Reviews of Infectious Diseases.**, v. 9, p.4-14. 1987.
- DUPONT, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.49, p.31-36. 2002.
- ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.49, p.7-10. 2002.

ERNEST, M.E. et al. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida ssp.* **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v.26, p.125-131. 1996.

FINTER, N. B. Dye uptake methods of assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assay. **J. Gen. Virol.**, v.5, p.419. 1969.

FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P. C.; OLOFSSON, G. Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods. **Chem. Phys. Lipids.**, v.105, p.201-213. 2000.

FLANAGAN, P.G., BARNES, R.A. Fungal infection in the intensive care unit. **J. Hosp. Infect.**, v.38, p.163-177. 1998.

FLOREY, K. Analytical profiles of drug substances. Academic Press, New York, San Francisco, London, v.6. 1977.

FORTI, R. L. et al. Objective antiviral assay of the interferons by computer assisted data collection and analysis. **Methos. Enzymol.**, v.5, p.533-40. 1986.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, p.499-511. 1996.

GABORIAU, F., CHÉRON, M., LEROY L., BOLARD, J. Physico-chemical properties of the heat-induced "superagregatés" of Amphotericin B. **Biophysical Chemistry.**, v.66, p.1-12. 1997.

GALL, D. The adjuvant activity aliphatic nitrogenous bases. **Immunology.**, v.11, p.369-386. 1966.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev Infect. Dis.**, v.12, p.308-329. 1990.

GERBAUD, E. et al. Persistent acute tubular toxicity after switch from conventional amphotericin B to liposomal amphotericin B (Ambisome). **J. Antimicrob. Chemother.**, v.51, p.473-475. 2003.

GONDAL, J.A.; SWAETZ, R. P.; RAHMAN, A. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.33, p.1544-1548. 1989.

GRABOWSKI, E.; MORRISON, I. *Particle size distribution from analysis of quasi-elastic light scattering data*. B. Dahneke (e.d.). **Measurements of suspended particles by quasi-elastic light scattering**, New York, Wiley-Interscience. 1983. p.199-236.

GRAYBILL, J. R. New antifungal agents. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, v.8, p.402-412. 1989.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. **Febs. Lett.**, v.14, p. 95-99. 1971.

GREGORIADIS, G. Carrier potential of liposomes in biology and medicine. **New Engl. J. Med.**, v.295, n. 14, p. 765-770. 1976.

GREGORIADIS, G. The immunological adjuvant and vaccine carrier properties of liposomes. **J. Drug Target.**, v.2, p.351-6. 1994.

GRUDA, I.; DUSSAULT, N. Effect of the state of Amphotericin B on its interaction with ergosterol. **Biochem. Cell Biol.**, v.66, p.177-183. 1988.

GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. **Vaccine.**, v.13, p.1263-1276. 1995.

GUYTON, A. C. **Human physiology and mechanisms of disease**. HBJ international 5^o edition, Philadelphia, Pennsylvania, W. B. Saunders. 1992.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J. Immunol. Methods.**, v. 119, p.203-210. 1989.

HANUS, L. H.; PLOEHN, H. J. Conversion of intensity-averaged photon correlation spectroscopy measurements to number-averaged particle size distributions. 1. Theoretical development. **Langmuir**, v.15, p.3091-3100. 1999.

HARREL, C.C.; HANF-KRISTUFEK, L. Comparison of nephrotoxicity of amphotericin B products. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, p.990-991. 2001.

HENRY, J. B. **Diagnóstico clínico e tratamento por métodos laboratoriais**. 19ª edição (2ª edição brasileira), Manole. 1999.

HIEMENZ, P.C. Principles of colloid and surface chemistry. 2ª edition, Marcel Dekker. 1986.

HILGERS, L. A. T. et al. Synergistic effects of synthetic adjuvants on the humoral immune response. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v.79, p.392-396. 1986.

HILGERS, L. A.; SNIPPE, H. DDA as an immunological adjuvant. **Res. Immunol.**, v.143, p.494-503. 1992.

HOLTEN-ANDERSEN, L. et al. Combination of the cationic surfactant dimethyl dioctadecyl ammonium bromide and synthetic mycobacterial cord factor as an efficient adjuvant for tuberculosis subunit vaccines. **Infect. Immunol.**, v.72, p.1608-1617. 2004.

HOSPENTHAL, D.O., GRETZINGER, K., ROGERS, A. Treatment of murine model of systemic candidiasis with liposomal amphotericin B bearing antibody to *Candida albicans*. **J. Med. Microbiol.**, v.30, p.193-197. 1989.

INUI, K.; MASUDA, S.; SAITO, H. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. **Kidney Int.**, v.58, p.944-958. 2000.

IUPAC. International union of pure and applied chemistry clinical chemistry division (IUPAC recommendations 1993). Disponível em: <<http://0-sis.nlm.nih.gov.csulib.ctstateu.edu/Glossary/main>>. Acesso em: 20 julho 2004.

JANKNEGT, R. et al. Liposomal and lipid formulations of amphotericin B: Clinical Pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet.**, v.23, p.279-291. 1992.

JULIANO, R. L. Liposomes As A Drug Delivery System. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.2, p.39-42. 1981.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia Básica**. 8ª edição, ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1995.

KANO, K. et al. Characterization of surfactant vesicle as a membrane mimetic agent. 2 temperature-dependent changes of turbidity, viscosity, fluorescence polarization of 2-methylantracene, and positron annihilation in sonicated dioctadecyldimethylammonium chloride. **J. Am. Chem. Soc.**, v.101, p.4030. 1979.

KARYOTAKIS, N.C. et al. Comparison of the efficacy of polyenes and triazoles against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic mice. **J. Infect. Dis.**, v.168, p.1311-1313. 1993.

KATZ, D. et al. Adjuvant effects of dimethyl ammonium bromide, complete Freund's adjuvant and aluminium hydroxide on neutralizing antibody responses to Semliki Forest virus in mice. **FEMS Immunol.**, v.3, p.305-320. 1991.

KATZ, D. et al. Comparison of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, Freund's adjuvant and mineral oil for induction of humoral antibodies, cellular immunity and resistance to Newcastle disease virus in chickens. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.4, p.303-313. 1993.

KATZ, D. et al. Adjuvant effects of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, complete Freund's adjuvant and aluminium hydroxide on neutralizing antibody, antibody-isotype and delayed-type hypersensitivity responses to Semliki Forest virus in mice. **FEMS Microbiol. Immunol.**, v.3, p.305-320. 1991.

KATZ, D.; KRAAIJEVELD, D. A.; SNNIPE, H. — **Synthetic lipoid compounds as antigen-specific immunostimulators for improving the efficacy of killed-virus vaccines.** In: STEWARDT-TULL, D. E. S. (ed) — *Theory and Practica Application of adjuvant.* Chichester, England, John Wiley & Sons., p. 37-50. 1995.

KIKUCHI, I. S.; VIVIANI, W.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Nucleotide insertion in cationic bilayers. **J. Phys. Chem. A.**, v.103, p.8050-8055. 1999.

KIKUCHI, I. S.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.. Interaction between DNA and Synthetic cationic liposomes. **J. Phys. Chem. B.**, v.104, p.2829-2835. 2000.

KLINGUER-HAMOUR, C. et al. Lipophilic quaternary ammonium salt acts as a mucosal adjuvant when co-administered by the nasal route with vaccine antigens. **Vaccine.**, v.19, p.4236-4244. 2001.

KLINGUER-HAMOUR, C. et al. DDA adjuvant induces a mixed Th1/Th2 immune response when associated with BBG2Na, a respiratory syncytial virus potential vaccine. **Vaccine.**, v.20, p.2743-2751. 2002.

KRAAIJEVELD, C. A. et al. Dimethyldioctadecylammonium bromide as an adjuvant for delayed type hypersensitivity and cellular immunity against Semliki Forest virus in mice. **Arch. Virol.**, v.65, p.211-217. 1980.

KRAAIJEVELD, C. A. et al. Effect of the adjuvant dimethyl dioctadecyl ammonium bromide on the humoral and cellular immune responses to encephalomyocarditis virus. **Antiviral Res.**, v.3, p.137-149. 1983.

Kremer, J. M. H. et al. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. **Biochemistry-US.**, v.16, p. 3932-3935. 1977.

KRETSCMAR, M. et al. Parameter for determination of *Candida albicans* virulence in murine peritonitis. **Mycoses.**, v.42, p.19-24. 1999.

KUNITAKE, S. T. et al. Molecular weight distributions of polydisperse systems: application to very low density lipoproteins. **Biochemistry.**, v.16, p.1936-1942. 1978.

- LAMY-FREUND, M. T. et al. Characterization and time dependence of amphotericin B: deoxycholate aggregation by quasielastic light scattering. **J Pharm Sci.**, v.80, p.262-6. 1991.
- LARSEN, S. T. Adjuvant effect of quaternary ammonium compounds in a murine model. **Toxicol Lett.**, v.151, p.389-398. 2004.
- LASIC, D. D. Liposomes. **Am. Scientist.**, v.80, p.20-31. 1992.
- LASIC, D.D, NEEDHAM, D. The "Stealth" liposome: A prototypical biomaterial. **Chem. Rev.**, v.95, p. 2601-2628. 1995.
- LASIC, D.D. Novel applications of liposomes. **TIBTECH.**, v.16, p.307-321. 1998.
- LASIC, D. D. et al. The structure of DNA-Liposome complex. **J. Am. Chem. Soc.**, v.119, p.832-833. 1997.
- LEGRAND, P. et al. Effect of aggregation and solvent on the toxicity of Amphotericin B to human erythrocytes. **Antimicrob. Agent Chemother.**, v.36, p.2518-2522. 1992.
- LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.52, p.412-418. 2003.
- LITWIN, C. M.; CALDERWOOD, S. B. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, p.137-149. 1993.
- LICHTENBERG, D. et al. Stability of mixed micellar bile models supersaturated with cholesterol. **Biophys J.**, v. 54, p.1013-25. 1988.
- LINDBLAND, E. B. et al. Adjuvant modulation of immune response to tuberculosis subunit vaccines. **Infect. Immunol.**, v.65, p.623-629. 1997.
- LOPEZ-BERESTEIN. et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. **J. Infect. Dis.**, v.151, p.704-710. 1985.

LOPEZ-BERESTEIN, G. et al. Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to candida albicans in mice with liposome-encapsulated amphotericin B. *J. Infect. Dis.*, v147, p.939-945. 1983.

Lopez-Berestein, G. Liposomes as carriers of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v 31, p.675-678. 1987.

LORIAN, V. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1980.

MARTIN, G.P.; EL-HAIRIR, MARRIOT, C. Bile salt- and lysophosphatidylcholine-induced membrane damage in human erythrocytes. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.44, p.646-650. 1992.

MARTINDALE. *The extrapharmacopeia*. Thirty-first edition, Royal Pharmaceutical Society, London., 1996. p.398-402.

MARTINS, L. M. S.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Cationic Vesicles as Bactericides. *Langmuir.*, v.13, p.5583-5587. 1997.

MEIJER, D. K. F.; Van Der SLUIJS. Covalente and noncovalent protein binding of drugs: Implications for hepatic clearance, storage, and cell-specific drug delivery. *Pharma. Res.*, v.6, p.105-118. 1989.

MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico*. Editora Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo, 1981.

MILLER, R. P.; BATES, J. H. Amphotericin B toxicity. *Ann. Intern. Med.*, v.71, p.1089-1095. 1969.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. Recognition by macrophages and liver cells of opsonized phospholipid vesicles and phospholipid headgroups. *Pharma. Res.*, v.18, p.1-8. 2001.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.*, v.53, p.283-318. 2001.

MORTARA, R. A.; QUINA, F.H.; CHAIMOVICHI, H. Formation of closed vesicles from a simple phosphate diester. Preparation and some properties of vesicles of dihexadecyl phosphate. **Biochem. Biophys. Research Commun.**, v.81, p.1080-1086. 1978.

MOURA, S. P.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Cationic bilayer fragments on silica at low ionic strength: Competitive adsorption and colloid stability. **Langmuir.**, v.19, p.6664-6667. 2003.

MUCKERHEIDE, A. et al. Cationization of protein antigens. **J. Immunol.**, v.138, p.833-837. 1987.

NANTES, I. L. et al. Nucleotide conformational change induced by cationic bilayers. **Arch Biochem Biophys.**, v.416, p.25-30. 2003.

NATIONAL COMMITTEE For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Reference methods for broth dilutions antifungal susceptibility testing of yeast.** Approved standard., NCCLS document M27-P., v.12., Villanova. 1992.

NATIONAL COMMITTEE For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Reference methods for broth dilutions antifungal susceptibility testing of yeast.** Approved standard., NCCLS document M27-A., v.17., Wayne, Pa, 1997.

NELSON, D. L., AND COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry.** 3rd ed., New York., Worth Publishers. 2000.

NUCCI, M. et al. Risk factors for death in patients with candidemia. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.19, p.846-850. 1998.

ODDS, F.C. **Candida and candidosis.** 2nd ed., London., Baillieri Tindall. 1988.

OLSEN, A. W. et al. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. **Infect. Immunol.**, v.69, p.2773-2778. 2001.

OTTO, B. R.; VERWEIJ-Van VUGHT, A. M. J. J.; MacLAREN, D. M. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. **Clin. Rev. Microbiol.**, v.18, p.217-233. 1992.

- PACHECO, L. F.; CARMONA-RIBEIRO, A, M. Effects of synthetic lipids on solubilization and colloid stability of hydrophobic drugs. *J. Colloid. Inter. Science.*, v.258, p.146-154. 2003.
- PANSU, R.B. et al. Vesicles versus membrane fragments in DODAC suspensions. *J. Phys. Chem.*, v.94, p.796-801. 1990.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy : a guide for students of organic chemistry.** W. B. Saunders Co.,(ED), Philadelphia. 1979.
- PFALLER, M. A. et al. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida* other than *Candida albicans*: Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.30, p.121-129. 1998.
- PFALLER, M., WENZEL, R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.11, p.287-291. 1992.
- PFALLER, M.A.; RINALDI, M.G. Antifungal susceptibility testing. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v.7, p.435-444. 1993.
- PFALLER, M. A.; REX, J. H.; RINALDI, M. G. Antifungal Susceptibility Testing: Technical advances and potential clinical applications. *Clin. Infects. Dis.*, v.24, p.776-784. 1997.
- PORNANONG, A. et al. The effect of serum albumin on the aggregation state and toxicity of amphotericin B. *J. Pharma. Sci.*, v.89, p.1589-1593. 2000.
- PRAGER, M. D. et al. Effect of dimethyldioctadecylammonium bromide induced macrophages on malignant cell proliferation. *Cancer Lett.*, v.27, p.225-232. 1985.
- REYNOLDS, E. S.; TOMKIEWICS, Z. M.; DAMMIN, G. J. The renal lesion related to amphotericin B treatment for coccidioidomycosis. *Med. Clin. North Amer.*, v.47, p.1149-1154. 1963.
- RINGEL, S. M. New antifungal agents for the systemic mycoses. *Mycopathologia*, v.109, p.75-87. 1990.

ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S., KUMAR, V. **Pathologic basis of disease**. 5^o edition, ed. W. B. Saunders company, Philadelphia, Pennsylvania. 1994.

ROSENFELD. **Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores**. Mem. Inst. Butantan., v.20, 1947. p.315-328.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. **Fungal Infections Diagnosis and Management**. Blackwell, London., 1993. p.207.

SAAG, M. S.; DISMUKES, W. E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.32, p.1-8. 1988.

SCHALES, O.; SCHALES, S.S., A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. **J. Biol. Chem.**, v.140, p.879-884. 1941.

SCHERRPHOF, G. et al. Uptake of liposomes by rat and mouse hepatocytes and kupffer cells. **Biol. Cell.**, v.47, p.47-57. 1983.

SCHMIDT, A. **A generalized Candida albicans infection model in the rat**. **Handbook of animal models of infection**. In: Zak, O., and Sande, M. A. (e.d.). San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto., Academic Press., 1999. p.657-662.

SCHREIER, S.; MALHEIROS, S. V. P.; DE PAULA, E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1508, p.210-234. 2000.

SCHUBER, F. et al. Liposomes: from membrane models to gene therapy. **Pure Appl. Chemother.**, v. 70, p.89-96. 1998.

SESSA, G.; WEISSMAN, G. Phospholipid spherules (Liposomes) as a model for biological membranes. **J. Lipid Res.**, v.9, n.3, p.310. 1968.

SHARKEY, P. K., et al. Amphotericin B lipid complex compared with amphotericin B in the treatment of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. **Clin Infect Dis.**, v.22, p.315-21. 1996.

SICCHIEROLLI, S. M.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO. Bacteria Flocculation and Death by Cationic Vesicles. *Langmuir*, v.11, p.2991-2995. 1995.

SIGLIN, J. C. & RUTLEDGE, G. M. **Laboratory animal management**. In: Derelanko, M. J., and Hollinger, M. A. (e.d.). *CRC Handbook of toxicology*. Boca Raton, New York, London, Tokyo., CRC Press., 1995. p.1-50.

SNIPPE, H.; BELDER, M.; WILLERS, J. M. N. Dimethyl-dioctadecylammonium-bromide as adjuvant for delayed hypersensitivity in mice. *Immunology*, v.33, p.931-936. 1977.

SNIPPE, H. et al. Specificity of murine delayed type hypersensitivity to conjugates of large or small haptens on protein carriers bearing lipid groups. *Immunology*, v.34, p.947-953. 1978.

SOUZA, L. C. et al. In-vitro and in-vivo studies of the decrease of amphotericin-B toxicity upon association with a triglyceride-rich emulsion. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.32, p.123-132. 1993.

SOUZA, L. C.; 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.*, v.44, p.77-84. 1999.

SOUZA, L. C. et al. Lipid emulsion reduces subacute toxicity of amphotericin B: a histopathological study. *Exp. Toxic. Pathol.*, v.52, p.169-175. 2000.

STANFIELD, I. P.; GALL, D.; BRACKEN, P. M. Single-dose antetetal tetanus immunization. *Lancet*, v.1, p.215-219. 1973.

SUGAR, A.M. Interactions of amphotericin B and SCH 39304 in the treatment of experimental murine candidiasis: lack of antagonism of polyene-azole combination. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.35, p.1660-1671. 1991.

TANCRÈDE, P. et al. The effect of surfactants on the aggregation state of Amphotericin B. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1030, p.289-295. 1990.

TÁPIAS, G. N. et al. Interactions between Cationic Vesicles and Escherichia Coli. **Langmuir**, v.10, p.3461-3465. 1994.

TASSET, C., PRÉAT, V., ROLAND, M. The influence of Myrj 59 on the solubility, toxicity and activity of Amphotericin B. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.43, p.297-302. 1991.

TRISSEL, L. A. **Amphotericin B. In: Handbook on injectable drugs.** American Society of Hospital Pharmacists ASHP (e.d.), Bethesda., 1988. p. 50-53.

TSURUTA, L.R. et al. Interactions between cationic liposomes and a antigenic protein: the physical chemistry of the immunoadjuvant action. **J. Lip. Res.**, v.38, p.2003-2011. 1997.

VANDEBOSSCHE, H.; WILLEMSSENS, G.; MARICHAL, P. Anti-Candida drugs - the biochemical basis for their activity. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.5, n. 1, p. 57 – 72. 1987.

VANDEBOSSCHE, H. Mechanisms of antifungal resistance. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.14, p. 44 – 49. 1997.

Van ROOIJ, E. M. A. et al. Protective antiviral immune responses to pseudorabies virus induced by DNA vaccination using dimethyldioctadecylammonium bromide as an adjuvant. **J. Virol.**, v.76, p.10540-10545. 2002.

VERONESI, R.; CORREA, A.; ALTERIO, D. Single dose immunization against tetanus: promising results in human trials. **Rev. Inst. Trop. Med. São Paulo.**, v.12, p.46-54. 1970.

VIEIRA, D. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. **J. Colloid. Inter. Sci.**, v.244, p.427-431. 2001.

VIEIRA, D. B. et al. Competitive Adsorption of Cationic Bilayers and Chitosan on Látex: Optimal Biocidal Action. **Langmuir.**, v.19, p.924-932. 2003.

WALSH, T. J. et al. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. **N. Engl. J. Med.**, v.340, p.764-771. 1999.

WENZEL, R. P. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. **Clin. Infect. Dis.**, v.20, p.1531-1534. 1995.

WENZEL, R. P.; PFALLER, M. A. *Candida* species: emerging hospital blood stream pathogens. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.12, p.523-524. 1991.

WERTLAKE, P. T. et al. Nephrotoxic tubular damage and calcium deposition following amphotericin B therapy. **Am. J. Pathol.**, v.43, p.449-457. 1963.

WEY, S. B. et al. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. **Arch. Intern. Med.**, v.148, p.2642-2645. 1988.

WINGARD, J. R. et al. A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipis complex in the empirical treatment of febrile neutopenia. **Clin. Infect. Dis.**, v.31, p.1155-1163. 2000.

WINSTON D. J.; SCHILLER, G. J. Controlled trials of amphotericin B lipid complex and other lipid-associated formulations. **Clin. Infect. Dis.**, v.30, p.236. 2000.

ZARIF, L. et al. Antifungal activity of amphotericin cochleates against *Candida albicans* infection in a mouse model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p.1463-1469. 2000.

* As referências bibliográficas foram organizadas segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) 6023/2000