

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

**Avaliação do tratamento da paracoccidioidomicose experimental
utilizando diferentes doses de anfotericina B nanoestruturada em
polímeros de ácido poli(lático-co-glicólico)**

Ana Camila Oliveira Souza

Brasília/DF

Agosto de 2012

ANA CAMILA OLIVEIRA SOUZA

**Avaliação do tratamento da paracoccidioidomicose experimental
utilizando diferentes doses de anfotericina B nanoestruturada em
polímeros de ácido poli(lático-co-glicólico)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília/DF

Agosto de 2012

Agradecimentos

*“Foi o tempo que dedicastes a tua rosa,
que fez tua rosa tão importante...”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

À **Deus**, pela vida repleta de bênçãos. Por me fazer seguir este caminho, que apesar de todos os infortúnios, me traz a certeza de ser feliz como Bióloga e como pesquisadora.

A minha querida família: minha mãe **Ester**, meu pai **José Filho**, meu irmão **José Neto**, pela educação, pelo amor e apoio incondicional. Por acreditarem em meu potencial, me incentivarem sempre e serem o combustível de toda essa luta. Essa conquista é nossa!
Aos demais familiares, pelo carinho e admiração.

À minha orientadora e amiga, profa. **Anamélia Lorenzetti Bocca**, através da qual inúmeras portas se abriram em minha vida acadêmica. Obrigada pela confiança que sempre depositou em mim, e pela paciência em me conduzir.

Ao meu querido **Gabriel Reis**, por colorir minha vida!

A todos meus amigos que já existiam e aos que tive a felicidade de conhecer graças a esse trabalho; não me atreverei em citar seus nomes para não ser injusta.

Aos meus fiéis irmãos, confidentes e conselheiros **Isaque Medeiros Siqueira** e **Márcio Sousa Jerônimo**, pela parceria, paciência, por todas as críticas, pelo carinho e respeito.
Obrigada pela amizade verdadeira!

Aos amigos e professores André Amaral, Alice Ribeiro, Yanna Karla, Ildinete Silva, Cecília Favali, Jaime Santana, Aldo Tavares e Kelly Guimarães pelos ensinamentos e contribuições inestimáveis. À professora Leonora Viana, por participar gentilmente desse trabalho realizando as análises histopatológicas e ser uma ótima companhia. Ao professor Cláudio Tedesco e toda sua equipe, pela colaboração na fabricação e envio das nanopartículas utilizadas nesse estudo. À professora Maria Sueli Felipe, pela co-orientação e pelo apoio financeiro.

Aos colegas de laboratório, que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável todos esses dias: Pedro Saavedra, Luiza Leonhardt, Flávia Motta, Raquel Negreiros, Keyla Caroline, Sabrina Portugal, Karina Smidt, Calliandra de Souza, Daniel Agostinho, Fabiana Brandão, Ádria Barros, Tatiana Jaramillo, Maritza Ocampo e tantos outros que não poderei mencionar, pela parceria.

À minha colega e colaboradora Nathalia Vasconcelos, que ajudou a conduzir etapas muito importantes deste trabalho, além de ser uma ótima companhia!

Aos meus aprendizes, com quem mais aprendi do que ensinei, e se tornaram grandes amigos: Fabíola Severiano, Raffael Castro, Yasmin Lima, Liliane Gomes e Tássia Milena. Aos demais estagiários do laboratório, pela ótima convivência!

A todos os colegas e técnicos de outros laboratórios e demais colaboradores, pela participação e contribuição, ainda que indireta, neste trabalho: Nelson (Medicina Tropical), “Glorinha” da Silva (FM), Tércia Lousa (FM), Jaqueline Almeida (FM) e Gledson Alessandro (FM).

Ao Laboratório de Imunopatologia de Brasília, em especial ao professor Florêncio Figueiredo e à técnica Viviane Mari, pela participação no processamento das amostras para histopatologia.

Ao Laboratório de Análise Clínicas do Hospital Universitário de Brasília, em especial ao Robério, pela participação nas dosagens bioquímicas do soro.

À Universidade de Brasília, que me abriga desde 2004 e onde se passaram as mudanças mais importantes de minha vida.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro.

Resumo

O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas tem se tornado uma importante estratégia para otimização da eficácia terapêutica de inúmeros fármacos, podendo ampliar sua atividade e reduzir sua toxicidade. A nanoestruturação da Anfotericina B (NANO-D-AMB), importante antifúngico usado no tratamento de algumas micoses sistêmicas, como a paracoccidiodomicose e a candidíase, apresentou eficácia no tratamento da paracoccidiodomicose (PCM) experimental, com atividade antifúngica similar à da anfotericina B deoxicolato (D-AMB) e possibilitando um menor número de aplicações. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi determinar a capacidade antifúngica e biocompatibilidade desta nova formulação *in vitro*, bem como comparar a eficácia terapêutica de diferentes doses de NANO-D-AMB com D-AMB e Ambisome® no combate a PCM murina. Para isso, determinou-se *in vitro* a concentração mínima inibitória de NANO-D-AMB em leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* e avaliou-se sua capacidade hemolítica e citotóxica em macrófagos peritoniais. Realizou-se também a infecção de camundongos BALB/c e posteriormente o tratamento com as nanopartículas em diferentes doses, D-AMB e Ambisome®. Foi observado que NANO-D-AMB apresentou eficácia antifúngica *in vitro* similar a Ambisome®, bem como menor indução de hemólise e menor citotoxicidade em comparação a D-AMB. Além disso, foi observada similar capacidade antifúngica *in vivo* em relação à D-AMB e Ambisome®, sem indução de alterações histológicas e nas funções renais e hepáticas, com a vantagem de permitir uma diminuição em 25% na quantidade de anfotericina B injetada. O tratamento com NANO-D-AMB e Ambisome® ajudaram a modular positivamente a resposta imunológica em favor do hospedeiro. Além disso, verificou-se que o uso de sobredoses não provocou toxicidade aguda. Juntos esses resultados sugerem NANO-D-AMB como uma alternativa ao uso de D-AMB e Ambisome®.

Palavras-chave: nanopartículas poliméricas, PLGA, anfotericina B, paracoccidiodomicose.

Abstract

The development of polymeric nanoparticles has become an important strategy for optimizing the therapeutic efficacy of many drugs, as it may expand their activities and reduce their toxicity. The nanostructuring of Amphotericin B (NANO-D-AMB), an important antifungal agent used to treat some systemic mycoses such as paracoccidioidomycosis and candidiasis, showed efficacy in treating experimental paracoccidioidomycosis (PCM), with antifungal activity similar to that of amphotericin B deoxycholate (D-AMB) and allowing a fewer number of applications. In this context, the aim of this study was to determine the antifungal activity of this new formulation and its biocompatibility *in vitro* and to compare the efficacy of different doses of NANO-D-AMB between D-AMB and Ambisome® in combating murine PCM. For this, it was determined *in vitro* minimum inhibitory concentration of NANO-D-AMB in *Paracoccidioides brasiliensis* yeasts, and it was evaluated its hemolytic and cytotoxic activities in peritoneal macrophages. Also, BALB/c mice were infected and then treated with the nanoparticles in different doses, D-AMB and Ambisome®. It was observed that NANO-D-AMB exhibited *in vitro* antifungal efficacy similarly to Ambisome® and induced lower hemolysis and cytotoxicity compared to D-AMB. Moreover, it was observed similar *in vivo* antifungal capacity in relation to D-AMB and Ambisome® without inducing changes in renal and hepatic histology and function, with the advantage of a 25% decrease in the amount of amphotericin B injected. Treatment with NANO-D-AMB and Ambisome® helped to positively modulate the immune response in favor of the host. Furthermore, it was found that the use of overdoses did not cause acute toxicity. Together, these results suggest NANO-D-AMB as an alternative to the use of D-AMB and Ambisome®.

Key words: *polymeric nanoparticles, PLGA, amphotericin B, paracoccidioidomycosis.*

Sumário

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
SUMÁRIO	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 NANOTECNOLOGIA E SUA APLICAÇÃO BIOMÉDICA	1
1.2 NANOPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS PARA CARREAMENTO DE FÁRMACOS	5
1.2.1 <i>Nanopartículas de PLGA</i>	7
1.3 INFECÇÕES FÚNGICAS	9
1.3.1 <i>Agentes antifúngicos</i>	10
1.3.2 <i>Paracoccidioidomicose</i>	16
1.4 JUSTIFICATIVA	20
1.5 OBJETIVOS	22
1.5.1 <i>Objetivo geral</i>	22
1.5.2 <i>Objetivos específicos</i>	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 AGENTES ANTIFÚNGICOS	23
2.1.1 <i>Anfotericina B deoxicolato (D-AMB)</i>	23
2.1.2 <i>Ambisome® (AMBISOME)</i>	23
2.1.3 <i>Anfotericina B nanoestruturada em polímeros de PLGA-DMSA (NANO-D-AMB)</i> .	
.....	23
2.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	25
2.2.1 <i>Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de NANO-D-AMB em leveduras de P. brasiliensis</i>	25
2.2.2 <i>Ensaio de hemólise</i>	25
2.2.3 <i>Avaliação de citotoxicidade em macrófagos peritoneais</i>	26
2.3 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	27
2.3.1 <i>Animais de experimentação</i>	27
2.3.2 <i>Fungo e infecção intratraqueal</i>	28

2.3.3	<i>Grupos experimentais e tratamentos</i>	28
2.3.4	<i>Eutanásia e coleta de tecidos</i>	30
2.3.5	<i>Quantificação de carga fúngica no tecido pulmonar</i>	32
2.3.6	<i>Histopatologia</i>	32
2.3.7	<i>Quantificação de parâmetros bioquímicos de toxicidade renal e hepática</i>	32
2.3.8	<i>Análise de genotoxicidade em medula óssea por citometria de fluxo</i>	33
2.3.9	<i>Contagem diferencial de leucócitos no lavado peritoneal</i>	34
2.3.10	<i>Ensaio de linfoproliferação de esplenócitos</i>	34
2.3.11	<i>Dosagem de citocinas</i>	35
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3	RESULTADOS	37
3.1	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	37
3.1.1	<i>Concentração Mínima Inibitória (CMI) de NANO-D-AMB em leveduras de P. brasiliensis</i>	37
3.1.2	<i>Ensaio de hemólise</i>	37
3.1.3	<i>Citotoxicidade em macrófagos peritoneais pelo ensaio do MTT</i>	38
3.2	DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA NANO-D-AMB EM DIFERENTES DOSES NO TRATAMENTO DA PCM MURINA	40
3.2.1	<i>Quantificação da carga fúngica pulmonar</i>	40
3.2.2	<i>Avaliação de danos hepáticos e renais</i>	44
3.2.3	<i>Genotoxicidade em células de medula óssea</i>	44
3.3	COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DE AMBISOME® E NANO-D-AMB NO TRATAMENTO DA PCM	45
3.3.1	<i>Quantificação da carga fúngica pulmonar</i>	45
3.3.2	<i>Avaliação da resposta imunológica após os tratamentos</i>	47
3.4	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	49
3.4.1	<i>Avaliação de danos hepáticos e renais</i>	50
3.4.2	<i>Contagem diferencial de células inflamatórias no peritônio</i>	52
3.4.3	<i>Genotoxicidade em células de medula óssea</i>	53
4	DISCUSSÃO	55
5	CONCLUSÃO	63
6	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	64
6.1	RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS	64
6.2	TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	66
6.3	ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTAS CIENTÍFICAS	67
6.4	ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO	67

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8	ANEXOS	78
8.1	DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA/FM/UNB)	78
8.2	REAGENTES E SOLUÇÕES	79
8.2.1	<i>Meio YPD (Yeast Peptone Dextrose)</i>	<i>79</i>
8.2.2	<i>PBS (Phosphate Buffered Saline).....</i>	<i>79</i>
8.2.3	<i>Corante/fixador hematológico Giemsa-Wright-Metanol</i>	<i>79</i>
8.2.4	<i>Formol tamponado para fixação de tecidos</i>	<i>80</i>
8.2.5	<i>Meio BHI (Brain Heart Infusion)</i>	<i>80</i>
8.2.6	<i>Fator de crescimento do isolado de P.brasiliensis Pb192 (FC Pb192)</i>	<i>81</i>
8.2.7	<i>Tampão de lise com Iodeto de Propídeo</i>	<i>81</i>
8.2.8	<i>Meio RPMI 1640.....</i>	<i>82</i>

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura química do PLGA e seus constituintes.....	8
Figura 2. Estrutura química da Anfotericina B	12
Figura 3. Porcentagem de hemólise induzida após 1h, 3h30 e 6 horas de tratamento com 600 – 1,56µg/mL de anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB), lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB).....	39
Figura 4. Porcentagem de macrófagos viáveis após 24, 48 e 72 horas de tratamento com 8 µg/mL de anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB), lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB).....	40
Figura 5. Quantificação de carga fúngica no tecido pulmonar em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> após 60 dias de tratamento com anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB) em diferentes doses.....	41
Figura 6. Fotomicrografia dos pulmões de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> após 60 dias de tratamento com anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB) nas doses de 6mg/kg/dia, 4,5mg/kg/dia e 3mg/kg/dia.....	43
Figura 7. Porcentagem relativa de fragmentação do DNA em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> após 60 dias de tratamento com anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB) ou nanoestruturada (NANO-D-AMB) em diferentes doses.....	45
Figura 8. Quantificação de carga fúngica no tecido pulmonar recuperadas em camundongos infectados com <i>P. brasiliensis</i> e tratados com anfotericina B lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB).....	46

Figura 9. Fotomicrografia dos pulmões de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> após 30 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB).....	47
Figura 10. Quantificação por ELISA de IL-12, IL-10 e TNF no macerado de pulmão em camundongos infectados com <i>P. brasiliensis</i> após 30 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB).....	48
Figura 11. Quantificação da capacidade linfoproliferativa de esplenócitos em camundongos infectados com <i>P. brasiliensis</i> após 30 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB).....	49
Figura 12. Fotomicrografia dos fígados de animais sadios 3 dias após tratamento com D-AMB, NANO-D-AMB e NANO-PLGA nas doses de 6mg/kg (1x) ou 30mg/kg (5x).....	51
Figura 13. Contagem diferencial de leucócitos peritoneais em animais sadios 3 dias após tratamento com D-AMB, NANO-D-AMB e NANO-PLGA nas doses de 6mg/kg (1x) ou 30mg/kg (5x).....	53
Figura 14. Porcentagem relativa de fragmentação do DNA em animais sadios 3 dias após tratamento com D-AMB, NANO-D-AMB e NANO-PLGA nas doses de 6mg/kg (1x) ou 30mg/kg (5x).....	54

Índice de Tabelas

Tabela 1. Níveis de Uréia, Creatinina, Ácido úrico, AST e ALT em animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com diferentes formulações de anfotericina B. 44

Tabela 2. Níveis de Uréia, Creatinina, Ácido úrico, AST e ALT em animais sadios 3 dias após tratamento com D-AMB, NANO-D-AMB e NANO-PLGA nas doses de indicadas. 52

Lista de abreviaturas

µg - Micrograma	EPR - Efeito de permeabilidade e retenção aumentadas
µL - Microlitro	FDA – Agência norte-americana <i>Food and Drug Administration</i>
µm - Micrometro	g - Grama
µM - Micromolar	h – Hora
°C - Graus Celsius	HE - Hematoxilina-Eosina
AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineethanesulfônico
ALT - Alanina-aminotransferase	HSP - Proteína de choque térmico
ANOVA - Análise de Variância	IFN-γ - Interferon gama
AST - Aspartato-aminotransferase	IL-10 - Interleucina 10
BHI - Meio Brain Heart Infusion	IL-12 - Interleucina 12
CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal	IL-2 - Interleucina 2
CMI - Concentração Mínima Inibitória	INPI - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
Con-A - Concanavalina A	kg - Kilograma
cpm - Contagens por minuto	L - Litro
D-AMB - Anfotericina B deoxicolato de sódio	LDL - Lipoproteínas de baixa densidade
DMSA - Ácido dimercaptosuccínico	LIB - Laboratório de Imunopatologia de Brasília Ltda.
DMSO - Dimetilsulfóxido	mg - Miligrama
DNA - Ácido Dexorribonucléico	mL - Mililitro
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético	mm - Milimetro
ELISA - Ensaio de Ligação Imunoenzimática	
EP 1:500 - Extrato protéico de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	

MTT - 3-(4,5-*Dimethylthiazol-2-yl*)-2,5-*diphenyltetrazolium bromide*

NANO-D-AMB - Anfotericina B
deoxicolato de sódio nanoestruturada em
polímeros de ácido poli(láctico-co-
glicólico)

NANO-PLGA – Nanopartículas de ácido
poli(láctico-co-glicólico)

nm - Nanometro

PA - Pró-análise

Pb192 - Isolado 192 de *Paracoccidioides
brasiliensis*

P&D&I - Pesquisa, Desenvolvimento e
Inovação

PBS - Tampão Salino Fosfato

PCM – Paracoccidioidomicose

pg - Picograma

pH - Potencial hidrogeniônico

PLA - Ácido poli-láctico

PLG - Ácido poli-glicólico

PLGA - Ácido poli(láctico-co-glicólico)

PVA - Álcool poli-vinílico

rpm - Rotações por Minuto

RNA – Ácido Ribonucléico

RPMI – Meio Roswell Park Memorial
Institute

SBF - Soro Bovino Fetal

SEM - Desvio Padrão da Média

Th - Linfócitos T helpers

TNF - Fator de Necrose Tumoral

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

YPD - Meio Yeast Peptone Dextrose

1 INTRODUÇÃO

1.1 NANOTECNOLOGIA E SUA APLICAÇÃO BIOMÉDICA

Segundo preconizado pelas “Diretrizes para a Pesquisa em Nanotecnologia”, Nanotecnologia é a criação e a utilização de materiais, dispositivos e sistemas na escala nanométrica (ROCO, M C *et al.*, 1999). A nanotecnologia é uma área de pesquisa inter e multidisciplinar, envolvendo diversos campos da ciência, dentre os quais a química, física, biologia e medicina (LEE, D.-E. *et al.*, 2012). O ramo da nanotecnologia que aplica seus princípios e técnicas na compreensão e transformação dos sistemas biológicos e que também utiliza ferramentas e materiais biológicos para criar novos dispositivos e sistemas integrados em escala nanométrica é denominado nanobiotecnologia (ROCO, MIHAIL C, 2003). A nanotecnologia tem sido frequentemente usada em várias aplicações, como na indústria de fibras e têxteis, agricultura, eletrônica, ciências forenses e espaciais e medicina terapêutica (KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010). Dentre os tipos de nanomateriais que vem sendo desenvolvidos, podemos citar os lipossomas, nanopartículas metálicas (como nanopartículas de ouro e de óxido de ferro), os “quantum dots” e os fulerenos ou “buckyballs”, nanotubos de carbono (KIM, B. Y. S. *et al.*, 2010), e em especial as nanopartículas poliméricas, incluindo micelas poliméricas, dendrímeros, fármacos conjugados e nanopartículas baseadas em polipeptídeos e polissacarídeos (ALEXIS *et al.*, 2008).

Segundo o relatório citado acima, os nanomateriais possuem entre 1 a 100nm de diâmetro (ROCO, M C *et al.*, 1999). No entanto, dentre a comunidade biomédica, partículas maiores, com até 1000nm, também são consideradas devido à sua semelhança em tamanho com nanopartículas naturais importantes como os vírus e outras moléculas biológicas, como o DNA e proteínas (NUNE *et al.*, 2009; SOPPIMATH *et al.*, 2001). Com essas dimensões, os nanomateriais apresentam propriedades únicas que os tornam excelentes candidatos para uso na biomedicina (JAIN, K. K., 2010; LEE, D.-E. *et al.*, 2012; NUNE *et al.*, 2009) e abrem caminho para o estabelecimento de um novo campo de estudos na ciência: a nanomedicina. Atualmente

nanomedicina é um tema prevalente na literatura e uma área de pesquisa que cresce rapidamente a cada dia (DOANE; BURDA, 2012). Os nanomateriais vêm sendo desenhados com intuito de transportar agentes terapêuticos (“nanofármacos”) e de diagnóstico pelas barreiras biológicas, acessar e quantificar moléculas, mediar interações moleculares, detectar mudanças moleculares com alta sensibilidade (KIM, B. Y. S. *et al.*, 2010) e até mesmo realizar nanocirurgias no organismo humano (JAIN, K. K., 2010).

Nanofármacos utilizados no tratamento de doenças severas como o câncer (MU; FENG, S. S., 2003), AIDS (COESTER *et al.*, 2000), diabetes (DAMGÉ *et al.*, 2007), malária (DATE *et al.*, 2007), tuberculose (AHMAD *et al.*, 2006), leishmaniose (COSTA LIMA *et al.*, 2012; SÁNCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2004) e diversas micoses (AMARAL, A C *et al.*, 2009; ITALIA, JAGDISHBHAI L *et al.*, 2011) estão em diferentes fases de ensaios clínicos e alguns já são comercializados (KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010). É possível citar ainda: nanopartículas para uso como biossensores para detecção de tumores, sua visualização e destruição; sondas nanoencapsuladas para a localização e quantificação de analitos em células vivas; nanomateriais conjugados a DNA que reconhecem fragmentos específicos para a genotipagem de polimorfismos de até mesmo um nucleotídeo; partículas bacterianas magnéticas funcionais integradas em nanomateriais com anticorpos e receptores para seu uso em imunoenaios na determinação de insulina e do hormônio gonadotropina coriônica humana (SPRINTZ, 2004).

Algumas propriedades dos nanomateriais permitem criar soluções e alternativas ao diagnóstico e terapêutica tradicionais (LEE, D.-E. *et al.*, 2012). A primeira delas é a facilidade de modificação, já que se comportam como plataformas para a construção de estruturas multifuncionais bem definidas com elevada estabilidade, podendo facilmente integrar mais de um agente terapêutico e/ou de imagem (DOANE; BURDA, 2012; LEE, D.-E. *et al.*, 2012). Sua estabilidade e versatilidade se complementam a uma elevada razão superfície/volume, o que permite o armazenamento e o carreamento de elevadas quantidades de um princípio ativo (DOANE; BURDA, 2012; KIM, B. Y. S. *et al.*, 2010; LEE, D.-E. *et al.*, 2012). A forma também possui efeito direto em como as nanopartículas funcionam *in vivo*, influenciando sua

interiorização pelas células e seu acúmulo no organismo (CHITHRANI *et al.*, 2006; DOANE; BURDA, 2012; GRATTON *et al.*, 2008), que são bem exemplificados no efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (*enhanced permeability and retention effect* – EPR), no qual nanopartículas maiores tendem a acumular-se em locais onde há uma vascularização anormal (como em tumores sólidos) muito mais que as nanopartículas menores (DOANE; BURDA, 2012; JAIN, R. K.; STYLIANOPOULOS, 2010; MAEDA *et al.*, 2000; NUNE *et al.*, 2009). Por fim, o acoplamento a moléculas específicas ou a otimização físico-química das propriedades de tamanho e superfície permitem o direcionamento das nanopartículas, levando ao aumento do tempo de circulação no sangue, proteção contra a opsonização e captura pelo sistema reticuloendotelial, prevenção de seu metabolismo rápido e depuração, encaminhamento eficaz e acúmulo em locais específicos (KIM, B. Y. S. *et al.*, 2010; LEE, D.-E. *et al.*, 2012). Todas essas propriedades (multifuncionalidade, elevada área superficial e diversidade estrutural e físico-química) tornam o campo da nanomedicina diverso e atrativo para a inovação e otimização de métodos terapêuticos (DOANE; BURDA, 2012; LEE, D.-E. *et al.*, 2012) e para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico por imagem, que permitem a avaliação da função celular e de processos moleculares nos organismos vivos sem os influenciar (NUNE *et al.*, 2009; WEISSLEDER, 2006).

Um dos maiores desafios no aperfeiçoamento de terapias para uma variedade de doenças humanas é o carregamento e liberação eficientes de fármacos a alvos específicos (DOANE; BURDA, 2012). Nesse sentido, os nanotransportadores são promissores no aumento da eficácia dos fármacos, pois podem ultrapassar múltiplas barreiras biológicas e otimizar a liberação do fármaco, além de possibilitar o direcionamento ao alvo específico e proteção contra a inativação e eliminação prematuras dos fármacos (ALEXIS *et al.*, 2008; DOANE; BURDA, 2012). Além disso, os nanofármacos podem permitir uma diminuição dos efeitos adversos prevenindo a captura não específica dos agentes terapêuticos em tecidos saudáveis e facilitando, assim, a adesão do paciente ao tratamento (ALEXIS *et al.*, 2008; KIM, B. Y. S. *et al.*, 2010).

Após quase 50 anos de desenvolvimento da nanomedicina, mais de 40 produtos completaram sua jornada do laboratório para o uso clínico de rotina (DUNCAN, RUTH;

GASPAR, 2011). Mas apesar dos muitos avanços, pouco se conhece sobre os efeitos adversos do uso das nanopartículas, e ainda há inúmeros desafios a serem enfrentados na pesquisa nanomédica e sua subsequente utilização na clínica (DOANE; BURDA, 2012; KIM, B. Y. S. *et al.*, 2010). Compreender as características únicas dos nanomateriais e suas interações com os sistemas biológicos é a chave para a implementação segura desses materiais na medicina de diagnóstico e terapêutica (KUNZMANN *et al.*, 2011). Para sua aplicação com segurança em um ambiente clínico, características com a biodistribuição, biocompatibilidade e biodegradação desses nanomateriais devem ser cuidadosamente avaliados (KUNZMANN *et al.*, 2011). O papel de algumas propriedades das nanopartículas, como o formato, a cobertura e a carga superficial têm sido explorados na determinação de quais propriedades específicas ditam a interação das nanopartículas com as células e influenciam na sua eliminação do organismo (DOANE; BURDA, 2012).

Uma questão importante a ser considerada é a de que os nanomateriais, mesmo que sejam fabricados de elementos inertes, tornam-se altamente reativos por suas dimensões nanométricas, o que pode resultar em efeitos tóxicos (AI *et al.*, 2011; MEDINA *et al.*, 2007). Fatores imunológicos, patológicos, farmacológicos e farmacodinâmicos controlam o comportamento e a biodistribuição de nanopartículas pelo organismo e por isso devem ser muito bem monitorados (AI *et al.*, 2011). Atualmente pouco se conhece sobre as conseqüências negativas da terapia com nanofármacos. Um dos principais problemas está relacionado à sua captura por fagócitos e conseqüente liberação de mediadores inflamatórios, ocasionando respostas imunológicas de padrões diversos que podem não ser desejadas e/ou controláveis (AI *et al.*, 2011; MEDINA *et al.*, 2007). A ocorrência de agregação plaquetária e conseqüente trombose e a indução de estresse oxidativo também podem ser ocasionados pelo tratamento com alguns tipos de nanomateriais (MEDINA *et al.*, 2007). Dessa forma, para ocorrer a tradução da pesquisa nanomédica no uso clínico, as pesquisas devem otimizar os nanomateriais e aplicá-los inicialmente em modelos animais de pequeno porte até extrapolar para modelos de primatas não humanos, a fim de conhecer todos seus efeitos e determinar a segurança de sua utilização (KIM,

B. Y. S. *et al.*, 2010). Estes estudos devem fornecer uma base sólida para a progressão da nanotecnologia como uma área nova e eficaz na prática médica. (KIM, B. Y. S. *et al.*, 2010).

Enquanto alguns nanomateriais ainda estão em fase de estudo *in vitro* e em modelos experimentais, outros já estão sendo estudados em ensaios clínicos e, no presente momento, dentre duas ou três dezenas de nanomateriais utilizados em diagnóstico ou terapia foram aprovados pela agência norte-americana FDA (US *Food and Drug Administration*) (KIM, B. Y. S. *et al.*, 2010; LEE, D.-E. *et al.*, 2012). Desses produtos, a maioria é composta por formulações simples e sem especificidade (por exemplo, Doxil®, Abraxane®, ou Feridex®) e são considerados nanomedicamentos de primeira geração (KIM, B. Y. S. *et al.*, 2010; LEE, D.-E. *et al.*, 2012). O sucesso dessas formulações tem estimulado a investigação e o desenvolvimento de diferentes tipos de nanoestruturas com alta especificidade e algumas vezes, com mais de um propósito clínico (ALEXIS *et al.*, 2008; LEE, D.-E. *et al.*, 2012).

1.2 NANOPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS PARA CARREAMENTO DE FÁRMACOS

Nas últimas décadas, houve um interesse considerável no desenvolvimento de nanopartículas de polímeros biodegradáveis como dispositivos para a liberação de fármacos (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Uma quantidade cada vez mais crescente de polímeros terapêuticos tem entrado no uso clínico como medicamentos nanoestruturados, inicialmente como agentes anticancerígenos mas atualmente para uma grande variedade de doenças e diferentes rotas de administração (DUNCAN, RUTH, 2011). Os polímeros biodegradáveis possuem baixa imunogenicidade e toxicidade, excelente biocompatibilidade e cinética de biodegradação (JAIN, R. A., 2000). Com isso as nanopartículas poliméricas têm a capacidade de carrear uma grande variedade de fármacos para diversas áreas do corpo, por períodos prolongados de tempo (HANS; LOWMAN, 2002) e de maneira alvo-específica, podendo assim minimizar efeitos adversos e aumentar o benefício terapêutico (KREUTER, JÖRG, 1994; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Nanopartículas biodegradáveis podem ser fabricadas de polímeros naturais ou sintéticos e podem ser utilizadas para o carreamento de drogas hidrofílicas, hidrofóbicas, proteínas, vacinas e macromoléculas biológicas (HANS; LOWMAN, 2002). Devido a seu tamanho sub-celular e sub-micrométrico, as nanopartículas podem penetrar profundamente nos tecidos através de capilares finos, atravessar as fenestrações presentes no revestimento epitelial e geralmente serem capturadas de forma eficiente pelas células, permitindo assim uma liberação eficiente de agentes terapêuticos ao sítio-alvo no corpo (PANYAM; LABHASETWAR, 2003). Modulando as características do polímero, é possível controlar a liberação de um agente terapêutico das nanopartículas, a fim de alcançar o nível desejado no tecido alvo e a duração necessária para eficácia terapêutica ótima (PANYAM; LABHASETWAR, 2003). Esses sistemas podem ser utilizados em geral para promover a liberação direcionada de drogas a tecidos ou células, aperfeiçoar a bioviabilidade, aprimorar a sua interação com o ambiente biológico, sustentar o efeito do agente no sítio-alvo e aumentar sua absorção, solubilizar drogas para liberação intravascular e melhorar a estabilidade de agente terapêuticos contra degradação enzimática (nucleases e proteases) prematura, especialmente fármacos de proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos (KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010; PANYAM; LABHASETWAR, 2003). Com isso, as formulações nanoestruturadas permitem aumentar a eficácia terapêutica, especificidade, índice terapêutico e tolerabilidade dos fármacos correspondentes, além de reduzirem os custos do paciente e riscos de toxicidade (KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010), fazendo com que esses sistemas ganhem cada vez mais uma atenção especial como dispositivos de carreamento de drogas (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

No processo de preparação das nanopartículas biodegradáveis, o fármaco pode ser dissolvido, retido, encapsulado ou anexado em uma matriz polimérica (KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010; PANYAM; LABHASETWAR, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001), formando nanopartículas, nanoesferas ou nanocápsulas (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Nanocápsulas são sistemas vesiculares nos quais a droga é confinada em uma cavidade envolvida por uma membrana polimérica única, enquanto as nanoesferas são sistemas de matriz nos quais a droga é fisicamente e uniformemente dispersada (SOPPIMATH *et al.*, 2001). O

mecanismo de liberação pode ser modulado através da massa molecular do polímero usado (KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010; ZAMBAUX *et al.*, 1999). Atualmente uma variedade de polímeros tem sido utilizados na formulação de nanopartículas biodegradáveis, sendo eles sintéticos, como os polímeros de ácido poli-lático (PLA), poli-glicólico (PLG), poli-acrilatos e poli-caprolactonas, ou naturais, tais como albumina sérica bovina, colágeno, gelatina, e quitosana (JAIN, R. A., 2000; MOGHIMI *et al.*, 2001; PANYAM; LABHASETWAR, 2003). Dentre estes, os poliésteres PLA, PGA e especialmente o co-polímero de ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) têm despertado grande interesse devido a sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo um dos polímeros biodegradáveis mais investigados para o carregamento de fármacos (JAIN, R. A., 2000; MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011; PANYAM; LABHASETWAR, 2003).

1.2.1 Nanopartículas de PLGA

O PLGA é um poliéster, formado pela polimerização dos ácidos lático (PLA) e glicólico (PGA) (**Figura 1**) (HANS; LOWMAN, 2002; MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011; PANYAM; LABHASETWAR, 2003). Estes polímeros são conhecidos tanto por sua biocompatibilidade e eliminação através de vias naturais (HANS; LOWMAN, 2002). No organismo, o co-polímero sofre hidrólise natural, formando porções biologicamente compatíveis e metabolizáveis que são eventualmente removidas do corpo através do ciclo do ácido cítrico na forma de dióxido de carbono e água (JAIN, R. A., 2000; MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011; PANYAM; LABHASETWAR, 2003). A degradação lenta não afeta a função celular normal (PANYAM; LABHASETWAR, 2003), incluindo também o fato de que o PLA e PLG são normalmente encontrados no organismo e participam de uma série de vias fisiológicas e bioquímicas, havendo um mínimo de toxicidade sistêmica associada ao uso do PLGA para o carregamento de drogas (MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011).

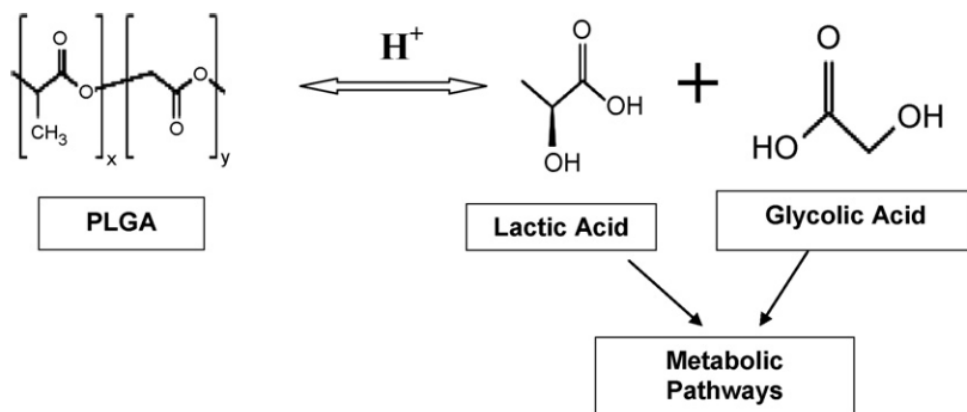


Figura 1. Estrutura química do PLGA e seus constituintes, em que x e y representam respectivamente as quantidades de ácido láctico (PLA) e ácido glicólico (PLG). O PLGA é biologicamente hidrolisado em PLA e PLG, os quais são metabolizados no Ciclo do Ácido Cítrico (KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010).

Um dos principais métodos de preparação de nanopartículas de PLGA é a emulsificação e evaporação do solvente (JAIN, R. A., 2000; KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010; MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011; PANYAM; LABHASETWAR, 2003). Nessa técnica, o polímero é primeiramente dissolvido em um solvente orgânico, como o diclorometano, clorofórmio ou acetato etílico (MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011; SOPPIMATH *et al.*, 2001). A droga é então dissolvida ou dispersa na solução polimérica pré-formada e em seguida a mistura é emulsificada usando um agente surfactante/emulsificante (geralmente álcool polivinílico) de modo a formar uma emulsão óleo/água (MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011; PANYAM; LABHASETWAR, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001). Após a formação da emulsão estável, o solvente orgânico é evaporado aumentando-se a temperatura ou pressão com contínua agitação da solução (MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011; SOPPIMATH *et al.*, 2001). Os parâmetros do processamento como a concentração dos polímeros ou do agente estabilizante e a velocidade de agitação possuem importante influência no tamanho das nanopartículas formadas e em sua degradação (JAIN, R. A., 2000; MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011; SOPPIMATH *et al.*, 2001). O fármaco retido na matriz de PLGA tem uma liberação sustentada, pela difusão da droga na matriz polimérica e sua degradação, que podem ser manipulados através da variação da proporção de PLA (aumento da hidrofobicidade) ou do PGA (aumento da

hidrofilicidade) e do peso molecular, podendo variar de dias a meses (HANS; LOWMAN, 2002; PANYAM; LABHASETWAR, 2003; SHIVE; ANDERSON, 1997).

As nanopartículas de PLGA têm sido usadas no desenvolvimento de nanomedicamentos baseados em proteínas, peptídeos e genes como sistemas de liberação *in vivo* (MAHAPATRO; SINGH, D. K., 2011). Alguns estudos demonstraram sua eficácia como carreadoras de agentes anticancerígenos, anti-hipertensivos, imunomoduladores e hormônios (BALA *et al.*, 2004).

1.3 INFECÇÕES FÚNGICAS

Os fungos são eucariotos heterotróficos conhecidos por sua biologia fascinante, por suas contribuições na fabricação de produtos alimentícios, como vinhos e queijos, e antibióticos, e por sua importância como patógenos de animais e plantas (ROMANI, 2011). Existem mais de 50 mil espécies, menos que 300 são patogênicos e pouco menos de uma dúzia causam 90% de todas as infecções fúngicas existentes (CHAKRABARTI, 2005; TÜREL, 2011). Esses microorganismos estão associados com uma ampla variedade de doenças em humanos e animais, desde manifestações pulmonares agudas auto-limitadas, alergias e lesões cutâneas em indivíduos imunocompetentes a doenças inflamatórias e infecções graves com risco de vida em pacientes imunossuprimidos (ROMANI, 2011). A incidência de doenças fúngicas aumentou significativamente nos últimos anos, como consequência do aumento de indivíduos imunossuprimidos em decorrência de doenças como o câncer e doenças autoimunes e os avanços no transplante de órgãos (ROMANI, 2011). Em virtude disso, as micoses, em especial as invasivas, têm se tornado um importante problema de saúde pública, tornando-se uma das principais causas de morte em pacientes imunocomprometidos (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006).

Clinicamente, há duas categorias de doenças fúngicas: as micoses superficiais, que envolvem pele ou mucosas; e as infecções invasivas ou sistêmicas, caracterizadas pelo envolvimento de múltiplos órgãos (ALMIRANTE; RODRÍGUEZ, 2007). A maioria das infecções superficiais são causadas por dermatófitos e leveduras, e são encontradas tanto na

comunidade quanto em pacientes hospitalizados, com fácil resolução e cura (ALMIRANTE; RODRÍGUEZ, 2007). Já as micoses invasivas são potencialmente fatais em indivíduos criticamente doentes e imunocomprometidos (ALMIRANTE; RODRÍGUEZ, 2007; CHAKRABARTI, 2005).

De modo geral, as micoses sistêmicas são as que contribuem de modo mais relevante para o aumento dos números de mortes em decorrência destas doenças (CHAKRABARTI, 2005). Sua etiologia pode ser classificada em dois grupos: as micoses endêmicas causadas por fungos patogênicos “verdadeiros” e as causadas por fungos “oportunistas”, que incluem uma vasta gama de fungos saprofíticos e comensais (CHAKRABARTI, 2005). Os fungos patogênicos “verdadeiros” são termodimórficos, apresentando-se em duas formas morfológicas distintas: uma forma infectiva, encontrada no hospedeiro ou a 37°C; e na forma de micélio, em cultura a 25-30°C. Estes fungos são causadores de micoses endêmicas, que costumam ter distribuição geográfica restrita e são causadas por espécies como *Histoplasma capsulatum*, *Histoplasma duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffei*, and *Sporothrix schenckii* (CHAKRABARTI, 2005). Contudo, no início dos anos 60, espécies como *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* começaram a causar doenças sistêmicas invasivas no mundo inteiro, em pacientes transplantados ou em tratamento para o câncer, diabetes e imunodeficiências, estabelecendo o início de uma intensa batalha contra os fungos “oportunistas” (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006; CHAKRABARTI, 2005).

1.3.1 Agentes antifúngicos

Assim como as células humanas, os fungos são organismos eucarióticos, o que torna mais difícil sua eliminação devido a problemas como toxicidade, resistência e eficácia terapêutica (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006; TÜREL, 2011). A maioria dos agentes antifúngicos interferem na biossíntese ou integridade do ergosterol, o principal esterol na membrana celular fúngica, enquanto outros causam a destruição da parede celular (ALMIRANTE; RODRÍGUEZ, 2007). Atualmente a terapia antifúngica é conduzida através de

um número reduzido de drogas antifúngicas, como a anfotericina B, o fluconazol e o itraconazol, embora novos agentes antifúngicos venham sendo introduzidos como opção de tratamento, a citar o voriconazol e a caspofungina (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006). Embora a anfotericina B ainda seja considerada a droga de escolha no tratamento de micoses severas, seus graves efeitos tóxicos agudos e crônicos, tais como a insuficiência renal, limitam o seu uso clínico. Por outro lado, a baixa suscetibilidade de fungos patogênicos emergentes (principalmente fungos filamentosos) aos derivados azólicos clássicos, como fluconazol ou cetoconazol, ampliou interesses de pesquisa para muitos outros compostos químicos com melhores perfis antimicrobiológicos (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006) e novas formulações de medicamentos pré-existentes, apresentando-se como importante alternativa a nanoestruturação de fármacos.

1.3.1.1 Anfotericina B

A anfotericina B é um antifúngico natural, da classe dos polienos, muito utilizada no controle de infecções fúngicas sistêmicas severas (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009) além de possuir atividade contra protozoários (espécies de *Leishmania*) e amebas (espécies de *Naegleria*) (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007). A anfotericina B é uma molécula cíclica assimétrica com uma face hidrofóbica e outra hidrofílica, e um grupo micosamina (**Figura 2**) (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007). Possui amplo espectro de ação e há poucos exemplos de resistência micológica a esta droga (ELLIS, 2002; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Em sua forma pura e pH fisiológico, é pouco solúvel em soluções aquosas e, por isso, requer conjugação com outro agente para administração clínica, como o deoxicolato de sódio (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Seu uso se dá principalmente pela administração intravenosa, que se torna inconveniente por longos períodos devido à necessidade de internação e necessidade de acesso venoso prolongado, além dos efeitos adversos e da toxicidade relacionados ao uso contínuo da anfotericina B (ELLIS, 2002; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

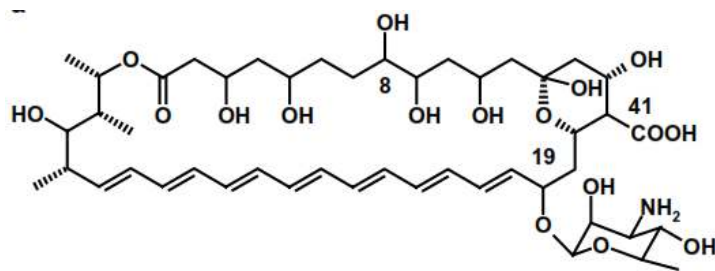


Figura 2. Estrutura química da Anfotericina B (LEMKE *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação da anfotericina B, que é comum aos polienos em geral, é baseada na ligação de sua porção hidrofóbica ao ergosterol presente na membrana celular dos fungos e responsável (BRAJTBURG; BOLARD, 1996), formando canais trans-membrânicos que levam a despolarização da membrana e aumento de permeabilidade, ocasionando o extravasamento de conteúdos citoplasmáticos e posterior morte celular (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007; ELLIS, 2002; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Embora com menor afinidade, a anfotericina B também possui a habilidade de ligar-se ao colesterol das membranas celulares de mamíferos, principal motivo de seu potencial tóxico (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Dentre os principais efeitos adversos agudos relacionados à administração parenteral de anfotericina B deoxicolato, pode-se citar náuseas, vômitos, febre, hipertensão/hipotensão e hipóxia (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Já o uso prolongado provoca importante nefrotoxicidade, levando à insuficiência renal, perda urinária de potássio e hipocalcemia, perda de magnésio, acidemia metabólica distal devido à acidose tubular renal e poliúria devido às diabetes *insipidus* nefrogênica (DERAY *et al.*, 2002; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

A anfotericina B é uma molécula anfipática e possui baixa solubilidade e permeabilidade, resultando em mínima absorção quando administrada oralmente (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Avanços nos sistemas de liberação de fármacos têm contornado alguns dos problemas de solubilidade que impedem a biodisponibilidade oral e novas formulações estão atualmente em

desenvolvimento (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; THORNTON; WASAN, 2009). Inúmeras são as tentativas de aprimorar as preparações de anfotericina B, objetivando melhor eficácia, mais tolerabilidade e menor toxicidade (especialmente renal) (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). A maior parte das abordagens é focada na conjugação da anfotericina B a lipídios e polímeros (VEN *et al.*, 2012).

Formulações comerciais para a anfotericina B

A primeira formulação para a anfotericina B e ainda hoje considerada como “padrão ouro” é a anfotericina B deoxicolato (antigo Fungizone®), uma dispersão micelar coloidal hidrofílica obtida a partir da associação da anfotericina B com o deoxicolato de sódio (BRAJTBURG; BOLARD, 1996; KLEINBERG, 2006; TORRADO *et al.*, 2008). Essa formulação convencional está disponível no mercado desde 1958 para o tratamento de micoses, mas infelizmente seu uso apresenta sérias desvantagens com a ocorrência de efeitos adversos importantes, como foi citado acima (LEMKE *et al.*, 2005; TORRADO *et al.*, 2008). Sua toxicidade é devida à associação da anfotericina B com lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e sua subsequente captura pelas células renais (VEN *et al.*, 2012; VYAS; GUPTA, S., 2006).

Após alguns anos de estudos, três formulações lipídicas foram desenvolvidas e hoje são permitidas para uso clínico: a AmBisome®, a Amphotec® e a Abelcet®. A AmBisome® é composta por pequenas vesículas lipídicas unilamelares de aproximadamente 80nm que formam uma bicamada estável, com elevado tempo de circulação sanguínea e penetração nos tecidos, o que reduz drasticamente seus efeitos tóxicos (ADLER-MOORE; PROFFITT, 2002; VYAS; GUPTA, S., 2006). A Amphotec® é composta de complexos constituídos de sulfato de colesterilo e Anfotericina B, formando discos finos com cerca de 120nm de diâmetro; embora o tamanho nanométrico, seu tempo de circulação é muito menor que o de AmBisome® e há rápida liberação às células fagocíticas (GUO, L. S. S.; WORKING, 1993; VYAS; GUPTA, S., 2006). A Abelcet® é composta de dois fosfolipídios sintéticos que formam fitas de até 10 µm de comprimento, sendo também rapidamente acumulados pelo sistema fagocítico mononuclear (JANOFF *et al.*, 1993; VYAS; GUPTA, S., 2006). Essas formulações lipídicas são melhor

toleradas que a anfotericina B deoxicolato e têm sido usadas principalmente em pacientes intolerantes à formulação convencional ou com função renal já comprometida (HIEMENZ; WALSH, 1996; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2003). No entanto, devido ao alto custo e à existência de terapias antifúngicas alternativas como os azóis e as equinocandinas, as formulações lipídicas são geralmente utilizadas como segunda linha terapêutica (FLÜCKIGER *et al.*, 2006; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Estudos propondo novas formulações lipídicas orais e uso de nanopartículas têm demonstrado eficácia antifúngica e menor toxicidade, além de permitirem aumento da acessibilidade do fármaco a órgãos e tecidos específicos (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

Novas formulações para a anfotericina B – nanopartículas poliméricas

A anfotericina B é um dos primeiros agentes terapêuticos a serem marcadamente comercializados em formulações nanométricas, nas quais a droga é associada com lipídios ou polímeros, reduzindo-se a toxicidade renal e melhorando o índice terapêutico (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007). Inúmeras formulações têm sido propostas, visando reduzir a concentração de anfotericina B livre no sangue e fazê-la alcançar a área alvo na sua máxima concentração (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006). Além de lipídios, a anfoterina B vem sendo conjugada a diversas macromoléculas, especialmente polissacarídeos, com o objetivo de aprimorar sua solubilidade e biodisponibilidade (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007). Em geral, tais abordagens permitem aumentar a dose tolerada da anfotericina B, enquanto a atividade antimicrobiológica é mantida ou melhorada em relação à anfotericina B deoxicolato.

É crescente a quantidade de estudos aprimorando a eficácia da anfotericina B em formulações nanoestruturadas com polímeros biodegradáveis. As primeiras tentativas de nanoestruturação em PLGA (VENIER-JULIENNE *et al.*, 1995) e poli(ϵ -caprolactona) (ESPUELAS *et al.*, 2003) não demonstraram resultados promissores (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007; KUMARI; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., 2010). A associação aos polissacarídeos de cargas opostas como a quitosana e sulfato de dextrana levaram a menor

toxicidade renal, mas devido ao tamanho das estruturas, sua eficácia poderia ficar restrita a determinados órgãos, como fígado e baço (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007; TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007). Alguns estudos demonstram a eficácia de microesferas contra *Leishmania* spp: microesferas de albumina tiveram toxicidade reduzida e aumento de capacidade antimicrobiana, com esperado acúmulo no fígado e baço (SÁNCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2004) e diminuição de citocinas antiinflamatórias e aumento de proinflamatórias, o que possivelmente contribuiu para sua eficácia (RAMA IÑIGUEZ *et al.*, 2006); outros polímeros como o PLGA e poli-anidrido também foram avaliados, mas se demonstraram inferiores às microesferas de albumina (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007; SÁNCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2005).

Em 2003, foi demonstrado que nanoesferas lipídicas de anfotericina B apresentaram a mesma atividade antifúngica e menor indução de hemólise *in vitro* e menor toxicidade renal *in vivo* do que o tratamento com o fármaco livre (FUKUI, 2003). O mesmo foi verificado para uma formulação de anfotericina B em nanopartículas de gelatina, cuja utilização apresentou menor indução de hemólise *in vitro* e baixos níveis séricos de uréia e creatinina, sugerindo baixa nefrotoxicidade *in vivo* (NAHAR; MISHRA, D.; DUBEY; JAIN, NARENDRA KUMAR, 2008). Nanopartículas de anfotericina B apresentaram maior eficácia *in vitro* do que a anfotericina convencional contra *Leishmania donovani*, levando a uma maior supressão da replicação do parasito no baço e a uma menor citotoxicidade contra macrófagos da linhagem J774A (MANANDHAR *et al.*, 2008). O tratamento com anfotericina B nanoestruturada em polímeros de PLGA de modelo murino aprimorou a biodisponibilidade oral do fármaco e apresentou nefrotoxicidade reduzida em comparação com a anfotericina convencional pela via intravenosa (ITALIA, J L; YAHYA; SINGH, D.; RAVI KUMAR, 2009). Por fim, diversos trabalhos recentes mostram a nanoestruturação da anfotericina B em polímeros de poliéster (ITALIA, J L *et al.*, 2012), gelatina (JAIN, S. *et al.*, 2012; NAHAR; MISHRA, D.; DUBEY; JAIN, NARENDRA KUMAR, 2008), poli-(butyl-cianocrilato) (XU *et al.*, 2011), alginato (SINGODIA *et al.*, 2011), poli(ϵ -caprolactona) (FALAMARZIAN; LAVASANIFAR, 2010; SHIM *et al.*, 2011; SINGH, P. *et al.*, 2011) e em especial de PLGA (AMARAL, A C *et al.*,

2009; COSTA LIMA *et al.*, 2012; ITALIA, J L; YAHYA; SINGH, D.; RAVI KUMAR, 2009; ITALIA, JAGDISHBHAI L *et al.*, 2011; NAHAR; JAIN, NARENDRA K, 2009; VEN *et al.*, 2012; VERMA *et al.*, 2011) como uma alternativa promissora para contornar os efeitos adversos induzidos pelo tratamento utilizando este fármaco.

Recentemente, Amaral et al. (2009) investigaram a atividade terapêutica de uma nova formulação para a anfotericina B associada ao ácido dimercaptosuccinico em mistura polimérica de PLGA (NANO-D-AMB) para o tratamento da paracoccidioidomicose experimental murino. Esta formulação foi capaz de reduzir o número de aplicações de uma dose diária para uma injeção a cada três dias, mostrando a mesma eficácia terapêutica do que a formulação convencional de anfotericina B deoxicolato (AMARAL, A C *et al.*, 2009; PI0700446-0). Estes resultados preliminares motivaram a continuação dos ensaios utilizando NANO-D-AMB.

1.3.2 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica da América Latina caracterizada como uma infecção granulomatosa e crônica, causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (BONIFAZ *et al.*, 2011; FERREIRA, M. S., 2009; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Acredita-se que a infecção se dá pela inalação de propágulos do fungo (conídios) ou injúrias de pele e mucosas, que são encontrados no ambiente natural na forma filamentosa (25°C), e no hospedeiro humano (37°C) se transformam em leveduras com múltiplos brotamentos que constituem a forma parasitária nos tecidos (BONIFAZ *et al.*, 2011; FERREIRA, M. S., 2009; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). O hábitat do fungo na natureza não é totalmente conhecido, mas o microorganismo pode ser isolado de matéria orgânica presente nos solos de regiões endêmicas, especialmente em áreas de cultivo de café e cana de açúcar, e possivelmente por essa razão a doença é prevalente em trabalhadores rurais (BONIFAZ *et al.*, 2011; FERREIRA, M. S., 2009; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Os humanos foram os primeiros hospedeiros naturalmente infectados identificados, mas atualmente há relatos de outros animais portadores da infecção, como tatus e cães (FERREIRA, M. S., 2009; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Os indivíduos infectados possuem faixa etária

entre 30 e 50 anos de idade, e mais de 90% dos casos são do sexo masculino (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006), já que hormônios femininos inibem a transição morfológica de conídio para levedura (BONIFAZ *et al.*, 2011). De modo geral, os indivíduos acometidos por essa micose estão na fase de maior produtividade, e por isso a doença leva a impacto social e econômico (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A PCM é comumente manifestada como uma pneumopatia de curso crônico, freqüentemente associada com lesões nas mucosas e pele, e eventualmente com lesões disseminadas extra-pulmonares (MARTINEZ, 2010). Quase sempre, a doença é assintomática (BONIFAZ *et al.*, 2011). A forma crônica é a mais prevalente, representando 90% dos pacientes com esta micose. Neste caso, acomete principalmente adultos homens entre os 30 e 60 anos de idade e sua progressão é lenta, principalmente com manifestações pulmonares, mas podendo ocorrer disseminação para mucosas e pele (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Já em crianças e adultos com menos de 30 anos é menos incidente e apresenta-se na forma aguda ou subaguda, caracterizando-se por linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006), representando apenas 5% dos casos. Caso não diagnosticada e tratada adequadamente, as lesões podem tornar-se mais graves e letais, com rápido e progressivo envolvimento de pulmões, tegumento, gânglios, baço, fígado e órgãos linfóides do tubo digestivo (BONIFAZ *et al.*, 2011; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

O controle da infecção se dá principalmente através de uma resposta imune celular efetiva de padrão Th1, com a presença de citocinas como as Interleucinas 2 (IL-2) e 12 (IL-12) e Interferon gama (IFN- γ), que ativam macrófagos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ resultando na formação de granulomas compactos (FERREIRA, M. S., 2009; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). No entanto, apesar de ser possível o controle da replicação do fungo através de uma resposta imune celular eficiente, formas quiescentes podem persistir no interior do granuloma (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Ocorrendo uma depressão da resposta Th1 e predominância de Th2, com ativação de linfócitos B, hipergamaglobulinemia e altos títulos de anticorpos específicos, leucocitose e eosinofilia, o paciente infectado evolui para a doença ativa,

quadro que pode ser revertido através de tratamento adequado (FERREIRA, M. S., 2009; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A PCM requer tratamento prolongado, podendo exceder mais de um ano, sendo que relapsos, complicações e seqüelas anatômicas e funcionais, como a temida fibrose pulmonar e conseqüente insuficiência respiratória, ocorrem em aproximadamente 20% dos pacientes (MARTINEZ, 2010). Diversas drogas estão disponíveis para a terapêutica, como as sulfonamidas, anfotericina B, cetaconazol e derivados triazólicos (itraconazol, fluconazol, voriconazol) (FERREIRA, M. S., 2009). As sulfas foram as primeiras a serem utilizadas no tratamento desta micose e ainda hoje são medicamentos ativos na infecção, especialmente a associação sulfametoxazol/ trimetoprim em casos severos (FERREIRA, M. S., 2009). A anfotericina B deoxicolato é a opção terapêutica para as formas severas, e é utilizada como primeira escolha na terapia intravenosa até a remissão da doença, em que o paciente deve ser transferido para a fase de manutenção com o uso de drogas orais (FERREIRA, M. S., 2009). No entanto, devido aos efeitos colaterais da anfotericina B, ela deve ser utilizada com cautela (FERREIRA, M. S., 2009). Com o advento do imidazol e de derivados triazólicos, houve uma revolução no tratamento desta doença, pois essas drogas são orais e facilmente administradas, com excelente atividade contra *P. brasiliensis*, bem toleradas e com poucos efeitos adversos, e, além disso, em alguns países, os tratamentos com fluconazol, voriconazol e itraconazol estão disponíveis em formulações intravenosas (FERREIRA, M. S., 2009). Apesar de haver poucos estudos de comparação com diferentes esquemas terapêuticos, o itraconazol é sugerido como a opção para controle de formas leves e moderadas da doença, podendo ser substituído pela combinação sulfametoxazol-trimetoprim (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Já em pacientes com formas mais graves e com necessidade de internação, a anfotericina B ou a associação de sulfametoxazol-trimetoprim por via endovenosa são as mais recomendadas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). A duração do tratamento relaciona-se à gravidade da doença e ao tipo de droga utilizada, e em geral é de longa duração, para permitir o controle das manifestações clínicas e evitar as recaídas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). O paciente deve permanecer

em tratamento e acompanhamento até a obtenção dos critérios de cura, com base nos parâmetros clínicos, radiológicos e sorológicos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A PCM é considerada a infecção sistêmica mais prevalente no Brasil e foi recentemente incluída na lista de doenças negligenciadas cujo impacto na saúde pública ainda não foi quantificado devido à falta de dados estatísticos (MARTINEZ, 2010). Dados epidemiológicos baseados em resultados de testes dérmicos de sensibilidade a paracoccidioidina no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina, apontam que mais de 50% dos habitantes de zonas endêmicas tenham sido expostos ao agente desta micose (MARTINEZ, 2010; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006), e no Brasil, estima-se que aproximadamente 10% da população esteja infectada (MARTINEZ, 2010). Se essa estimativa é real, a prevalência da PCM seria similar à da Doença de Chagas na América Latina e superior à de outras doenças negligenciadas como esquistossomose e leishmaniose (MARTINEZ, 2010). A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo registra aproximadamente 40 novos casos a cada ano (MARTINEZ, 2010). No Brasil, o dado mais recente de mortalidade foi determinado no período de 1996 a 2006, sendo 1 a cada 1 milhão de habitantes (MARTINEZ, 2010). Dentre as mais relevantes micoses sistêmicas, a PCM foi responsável pela maior parte das mortes, com uma média anual de 168 mortes durante 1996 a 2006 (MARTINEZ, 2010). Após 100 anos de sua descoberta, ainda há a necessidade de se implantar um programa efetivo e permanente para a prevenção e diagnóstico da PCM e para a provisão de agentes antifúngicos e assistência aos pacientes com complicações e seqüelas (MARTINEZ, 2010).

1.3.2.1 Modelo experimental

Vários modelos animais de infecção por *P. brasiliensis* já foram descritos, mas atualmente o que representa melhor a PCM humana é a infecção em camundongos. Os camundongos são infectados pela via intratraqueal, intranasal ou endovenosa, reproduzindo tanto a doença pulmonar quanto a disseminada. No entanto, até então não há um modelo animal que simule a doença fatal humana.

A doença murina pode ser induzida tanto pela infecção por leveduras como por conídios, esta última simulando a contaminação natural. Assim como ocorre em outras micoses, o controle da infecção depende principalmente da interação inicial do fungo com os mecanismos de defesa do hospedeiro. Neste modelo, a cinética da resposta inflamatória pulmonar consiste em três estágios: (1) um estágio inflamatório inicial com a presença de polimorfonucleares e estiócitos; (2) um estágio granulomatoso misto, com concomitante presença de polimorfonucleares; e (3) um estágio granulomatoso e fibroso, caracterizado pela presença de células gigantes, estiócitos, macrófagos e tecido conjuntivo fibroso (COCK *et al.*, 2000; KERR *et al.*, 1988; RESTREPO, S. *et al.*, 1992).

Esse modelo experimental proporcionou a maior parte do conhecimento sobre as respostas imunológicas elicitadas pelo fungo. Calich *et al.* (CALICH *et al.*, 1985) desenvolveram um modelo murino isogênico no qual a linhagem B10.A é suscetível, enquanto camundongos A/Sn são resistentes à *P. brasiliensis*. Como ocorre em humanos, camundongos resistentes apresentam eficiente ativação de macrófagos, presença de resposta de hipersensibilidade tardia, baixos níveis de anticorpos específicos e uma tendência à resolução da doença. Por outro lado, camundongos susceptíveis parecem montar uma resposta imune de padrão Th2, com ativação ineficiente de macrófagos, baixa resposta de hipersensibilidade tardia e altos níveis de anticorpos específicos, resultando em doença progressiva (GONZÁLEZ, A.; RESTREPO, ANGELA; *et al.*, 2008; SINGER-VERMES *et al.*, 1993). Neste estudo utilizou-se a linhagem BALB/c, que possui uma susceptibilidade intermediária à doença (CALICH *et al.*, 1985).

1.4 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novos medicamentos contra as micoses é uma necessidade para a saúde mundial, principalmente pelo crescente número de casos de resistência surgidos em pacientes imunocomprometidos, o que requer um aumento nas doses dos antifúngicos atuais, resultando em sérios efeitos tóxicos. Uma solução encontrada para reverter este problema é o

desenvolvimento de novas formulações para medicamentos convencionais usando a nanobiotecnologia, permitindo, por exemplo, diminuir o número de aplicações do fármaco durante a terapia (AMARAL, A C *et al.*, 2009).

Nosso grupo tem estudado o efeito de algumas formulações nanoestruturadas para vacinas (RIBEIRO, A. *et al.*, 2012), peptídeos (AMARAL, A C *et al.*, 2010) e fármacos antifúngicos (AMARAL, A C *et al.*, 2009; CUNHA-AZEVEDO *et al.*, 2011) no tratamento de micoses com resultados promissores. Em 2009, Amaral *et al.* demonstraram que a nanoestruturação da anfotericina B em PLGA (NANO-D-AMB) levou à redução da carga fúngica no hospedeiro, além de não apresentar os efeitos adversos causados por este fármaco na sua forma convencional, incluindo a importante vantagem de reduzir o número de aplicações e manter a mesma a eficácia terapêutica (AMARAL, A C *et al.*, 2009).

Baseando-se nesse estudo preliminar, e utilizando-se das propriedades das formulações nanoestruturadas, tais como a liberação sustentada, considerou-se que esta estratégia poderia ser usada para diminuir ainda mais a quantidade necessária de anfotericina B a ser injetada durante o combate às infecções fúngicas e, assim, garantir a segurança farmacêutica em pacientes imunocomprometidos, que já estão sob uso de outros medicamentos. Dessa forma, este estudo teve como foco principal aprimorar o tratamento experimental com NANO-D-AMB desenvolvido por Amaral *et al.* (2009), afim de consolidar esta formulação como uma nova opção ao uso da anfotericina B. Este é um projeto de cunho biotecnológico, que envolveu a realização de etapas de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, e passível de resultar em um produto que poderá ser usado para melhorar a qualidade de vida e a segurança no tratamento de pacientes acometidos pelas doenças fúngicas.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia terapêutica da anfotericina B nanoestruturada (NANO-D-AMB) utilizada em diferentes doses no tratamento da paracoccidiodomicose experimental, no que diz respeito à capacidade antifúngica e indução de efeitos adversos.

1.5.2 Objetivos específicos

- 1) Verificar *in vitro* a eficácia antifúngica de NANO-D-AMB em comparação à D-AMB e AMBISOME® em leveduras de *P. brasiliensis*.
- 2) Comparar *in vitro* a indução de toxicidade de NANO-D-AMB em relação à D-AMB e AMBISOME® em células sanguíneas humanas e macrófagos peritonias murinos.
- 3) Comparar a eficácia terapêutica de três doses decrescentes de NANO-D-AMB com a anfotericina B livre (D-AMB) no tratamento da paracoccidiodomicose experimental, por meio da quantificação de carga fúngica pulmonar, histopatologia, quantificação de parâmetros bioquímicos de toxicidade renal e hepática e análise de genotoxicidade.
- 4) Comparar o tratamento da paracoccidiodomicose experimental utilizando NANO-D-AMB e a anfotericina B lipossomal (AMBISOME®), avaliando-se a eficácia antifúngica por meio da quantificação da carga fúngica pulmonar e histopatologia, e a habilidade de ambas as formulações em modular a resposta imunológica, avaliando-se a capacidade linfoproliferativa diante de antígenos específicos e as algumas citocinas no pulmão.
- 5) Avaliar a indução de toxicidade aguda *in vivo* por sobredoses de NANO-D-AMB em comparação à D-AMB, por meio de análise histopatológica, quantificação de parâmetros bioquímicos de toxicidade renal e hepática, análise da população de leucócitos peritonias e de genotoxicidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AGENTES ANTIFÚNGICOS

2.1.1 Anfotericina B deoxicolato (D-AMB)

Neste estudo, para representar a formulação convencional utilizada nos tratamentos com anfotericina B, utilizou-se a anfotericina B deoxicolato (Sigma, EUA) contendo ~45% de anfotericina B pura e ~35% de deoxicolato de sódio, referida aqui como formulação “livre”. Respeitando-se a dose diária de D-AMB recomendada (2 mg/kg) (DERAY *et al.*, 2002; DUPONT, 2002; KLEINBERG, 2006) para terapia sem ocorrência de efeitos adversos e considerando o peso médio de um camundongo BALB/c (20 g), injetou-se 40 µg por dia em cada animal. Para isso, uma solução contendo 0,4 mg/mL de anfotericina B deoxicolato de sódio em PBS foi mantida a 4 °C no escuro por até uma semana, aplicando-se 100 µL (40 µg) em cada animal pela via intraperitoneal **diariamente**.

2.1.2 Ambisome® (AMBISOME)

A formulação comercial lipossomal de anfotericina B Ambisome® (Gilead, EUA) também foi utilizada neste estudo. Tratando-se de uma formulação melhor tolerada e visando uma comparação direta com a formulação nanoestruturada a ser estudada neste trabalho, os tratamentos com Ambisome® ocorreram utilizando-se uma dose 3 vezes maior que a de D-AMB, ou seja, 6mg/kg. Para isso, uma solução contendo 1,2 mg/mL de anfotericina B lipossomal em PBS foi mantida a 4 °C no escuro por até uma semana, aplicando-se 100 µL (120 µg) em cada animal pela via intraperitoneal **a cada três dias**.

2.1.3 Anfotericina B nanoestruturada em polímeros de PLGA-DMSA (NANO-D-AMB)

A formulação da anfotericina B em mistura polimérica contendo 120 µg/100 µL de anfotericina B deoxicolato (~45% de anfotericina B pura e ~35% de deoxicolato de sódio,

Sigma, EUA) foi preparada pela equipe do professor Dr. Antônio Cláudio Tedesco da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP (AMARAL, A C *et al.*, 2009).

Para a fabricação das nanopartículas foram utilizados os polímeros pré-formados dos ácidos poli-láctico (PLA, 15 a 75%) e poli-glicólico (PGA, 15 a 75%) e o ácido dimercaptosuccínico (DMSA, 0,05M), todos da marca Sigma (EUA). O processo de preparação e a sua utilização estão protegidos pelo depósito da patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI, Brasil) sob registro PI # 0700446-0. Resumidamente, os polímeros pré-formados foram primeiramente dissolvidos em diclorometano com 50 mg de PLA e 50 mg de PGA (proporção 50:50). A esta solução orgânica foi adicionado poli-vinil álcool (PVA, 1%) e 120 mg de anfotericina B deoxicolato de sódio com o aditivo DMSA. O material foi submetido à agitação vigorosa (10000 rpm) para obter a emulsificação inicial. O solvente orgânico foi removido da solução sob agitação à temperatura ambiente e evaporação sob pressão reduzida. As nanopartículas foram centrifugadas (25°C, 5000 rpm) em intervalos de 10 minutos, lavadas três vezes em água destilada, ressuspensas em 1 mL de PBS estéril e armazenadas a 4°C. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis. Imediatamente antes do uso, o frasco contendo as nanopartículas foi agitado vigorosamente durante dois minutos para ressuspender as nanopartículas (AMARAL, A C *et al.*, 2009).

Assim como no trabalho de Amaral *et al.* (2009), considerou-se que esta formulação nanoestruturada era capaz de liberar seu conteúdo de anfotericina B a cada três dias, já que observações preliminares utilizando técnicas de detecção fluorométrica detectaram esse perfil (Dr. Cláudio Tedesco comunicação pessoal). Dessa forma, neste trabalho, além de se repetir a terapia utilizando 6mg/kg de NANO-D-AMB, utilizou-se ainda as doses menores de 3 e 4,5mg/kg, aplicando-se respectivamente 100 µL (120 µg), 50 µL (60 µg) e 80 µL (96 µg) de NANO-D-AMB por animal pela via intraperitonal **a cada três dias**. Como controle, utilizou-se nanopartículas formadas pelo mesmo procedimento sem a adição da anfotericina B deoxicolato de sódio (NANO-PLGA).

2.2 ENSAIOS *IN VITRO*

2.2.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de NANO-D-AMB em leveduras de *P. brasiliensis*

Para avaliar a capacidade antifúngica de NANO-D-AMB diretamente em leveduras de *P. brasiliensis*, realizou-se o ensaio *in vitro* de determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI). Esse ensaio tem como objetivo determinar a menor concentração da droga testada capaz de inativar o agente microbiológico em questão (NISHI *et al.*, 2009). Para isso, preparou-se um inóculo de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) obtidas após cultivo por 7 dias em meio BHI líquido numa concentração de 10^6 células/mL em meio BHI contendo 4% de Glicose e 4% de Soro Bovino Fetal. Foram plaqueados 100µL/poço deste inóculo em placa de 96 poços juntamente com 100µL/poço de uma solução de meio contendo os fármacos em diluições seriadas nas concentrações finais entre 1,71 a 600µg/mL de anfotericina B. Considerando os prováveis tempos de liberação da anfotericina B da mistura polimérica, após 24h, 72h e 7 dias de incubação com os fármacos a 37°C e 150 rpm, o conteúdo de cada poço foi plaqueado em meio Agar BHI contendo 4% de Glicose e 4% de Soro Bovino Fetal (ANEXO) e incubado a 37°C por 21 dias. A menor concentração de fármaco no cultivo que impediu o crescimento de leveduras nas placas foi considerada a CMI. O experimento foi realizado três vezes de forma independente, sendo que em cada um as amostras foram testadas em duplicata.

2.2.2 Ensaio de hemólise

Considerando o fato de os tratamentos utilizando anfotericina B serem conduzidos principalmente pela via endovenosa na clínica médica, foi realizado este ensaio para determinar a capacidade hemolítica das formulações estudadas. Sangue humano fresco, obtido de voluntários saudáveis, foi coletado utilizando tubos tratados com EDTA e as células vermelhas foram obtidas a partir da centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e as células foram lavadas com PBS por 3 vezes. Três partes de células sanguíneas foram diluídas em 11 partes de PBS e utilizou-se 10µL desta solução para cada 100µL de reação,

conforme previamente descrito (ITALIA, J L; YAHYA; SINGH, D.; RAVI KUMAR, 2009; NAHAR; MISHRA, D.; DUBEY; JAIN, NARENDRA KUMAR, 2008).

Tratou-se as células com água destilada (considerada amostra controle com 100% de hemólise), PBS ou com os fármacos nas concentrações finais variando de 1,56 a 600µg/mL. Incubou-se a 37°C e após 1, 3,5 e 6 horas as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi mantido por 30 minutos à temperatura ambiente para oxidação da hemoglobina e a absorbância a 540 nm foi determinada utilizando um espectofotômetro de placas (ITALIA, J L; YAHYA; SINGH, D.; RAVI KUMAR, 2009; NAHAR; MISHRA, D.; DUBEY; JAIN, NARENDRA KUMAR, 2008). O experimento foi realizado três vezes de forma independente, sendo que em cada um as amostras foram testadas em duplicata. O cálculo da porcentagem de hemólise foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = (100 \times A_H) / A_{dH_2O}$$

A_H : Absorbância da amostra

A_{dH_2O} : Média das absorbâncias das amostras tratadas com água destilada

2.2.3 Avaliação de citotoxicidade em macrófagos peritoniais

Para avaliar a capacidade das formulações estudadas de induzir citotoxicidade em células de mamíferos, foi realizado o ensaio colorimétrico de viabilidade com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983).

Macrófagos peritoniais de camundongos Balb/c sadios foram obtidos por meio de lavagem peritoneal com 10mL de RPMI simples gelado. O lavado foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C e as células foram ressuspensas em 1mL/animal de RPMI simples gelado. A concentração de células foi determinada utilizando-se um hemocitômetro e a viabilidade foi determinada utilizando o corante Azul de Tripán a 0,4%.

Preparou-se uma suspensão contendo 5×10^6 células/mL e 100µL da mesma foram plaqueados em placas de 96 poços de fundo chato. As células foram incubadas por 1 hora a 37°C com 5% CO₂ e após este período o sobrenadante contendo as células mortas/não aderentes foi descartado, acrescentando a cada poço um volume de 200µL de RPMI suplementado para cultura de macrófagos (ANEXO).

Após 24 horas de cultivo, descartou-se novamente o sobrenadante de cada poço e foi acrescentado 200µL de RPMI suplementado contendo as soluções de fármacos numa concentração de 8µg/mL de anfotericina B deoxicolato (D-AMB ou NANO-D-AMB) ou a quantidade correspondente de NANO-PLGA.

Após 24h, 48h, e 72 horas de incubação com os fármacos, acrescentou-se 22µL de reagente de MTT a 5mg/mL e incubou-se a 37 °C com 5 % CO₂ por 4 horas no escuro. Em seguida os sobrenadantes foram descartados e a cada poço acrescentou-se 100µL de DMSO. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro de microplacas a 540nm. Macrófagos cultivados nas mesmas condições sem a presença de fármacos foram utilizados como controle e considerados no cálculo da porcentagem de viabilidade após cada tempo de cultivo. (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN, 1983; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987). O experimento foi realizado duas vezes de forma independente, sendo que em cada um as amostras foram testadas em triplicata. O cálculo da porcentagem de células vivas foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ células vivas} = (100 \times A_V) / A_{RPMI}$$

A_V : Absorbância da amostra

A_{RPMI} : Média das absorbâncias das amostras tratadas com RPMI

2.3 ENSAIOS *IN VIVO*

2.3.1 Animais de experimentação

Camundongos BALB/c fêmeas com 6-8 semanas de idade e pesando 20-22g foram adquiridos do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo-SP e mantidos em gaiolas de polipropileno em condições controladas de luminosidade e com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os protocolos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília-DF (ANEXO).

2.3.2 Fungo e infecção intratraqueal

Leveduras virulentas de *P. brasiliensis* (isolado virulento Pb18) foram incubadas a 37°C sob agitação de 150 rpm em meio YPD líquido (ANEXO). Após 7 dias de cultivo, aliquotou-se a cultura em tubos de 50 mL e centrifugou-se a 2500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline* – PBS, ANEXO) estéril. Ao final as células foram ressuspensas em 20 mL de PBS estéril. A concentração de leveduras foi determinada utilizando-se um hemocítmetro e a sua viabilidade foi verificada através da coloração com Verde Janus a 0,05% (BERLINER; RECA, 1967), sendo que a porcentagem de leveduras viáveis era maior que 80%. A concentração de células foi ajustada para 6×10^6 leveduras viáveis/mL e esta solução foi utilizada como inóculo para a infecção.

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com 80 mg/kg de cetamina (Cetamin®, Rhobifarma, Brasil) e 10 mg/kg de xilazina (Xilazin®, Rhobifarma, Brasil). Uma incisão longitudinal foi feita na porção ventral do pescoço, de modo a expor a traquéia. Utilizando uma seringa graduada de 1 mL, injetou-se 50 µL do inóculo (contendo 3×10^5 leveduras viáveis) no interior da traquéia do animal. A incisão foi suturada utilizando fio de polipropileno n° 6 e os animais foram mantidos em ambiente aquecido até o término da sedação. Os procedimentos acima descritos foram realizados com base no trabalho de MARQUES e colaboradores (2008).

2.3.3 Grupos experimentais e tratamentos

2.3.3.1 Comparação da eficácia de diferentes doses de NANO-D-AMB no tratamento da PCM

Visando comparar a eficácia de doses diferentes de NANO-D-AMB com a formulação livre D-AMB, os camundongos foram infectados e após 30 dias foram distribuídos nos grupos experimentais enumerados abaixo e iniciaram-se os respectivos tratamentos. Os animais foram submetidos a 60 dias de tratamento pela via intraperitoneal e em seguida foram eutanasiados.

Como controle utilizou-se camundongos não infectados e não tratados. O experimento foi realizado três vezes de forma independente, com um número de 5 camundongos por grupo.

1. **SADIOS**: animais não infectados e não tratados.
2. **D-AMB 2mg/kg/dia**: animais infectados e tratados **diariamente** com uma dose de **40µg/100µL** de D-AMB.
3. **NANO-D-AMB 6mg/kg/3dias**: animais infectados e tratados **a cada três dias** com uma dose de **120µg/100µL** de NANO-D-AMB.
4. **NANO-D-AMB 4,5mg/kg/3dias**: animais infectados e tratados **a cada três dias** com uma dose de **96µg/80µL** de NANO-D-AMB.
5. **NANO-D-AMB 3mg/kg/3dias**: animais infectados e tratados **a cada três dias** com uma dose de **60 µg/50µL** de NANO-D-AMB.
6. **NANO-PLGA**: animais infectados e tratados **a cada três dias** com uma dose de **100µL** de nanopartículas sem anfotericina B (NANO-PLGA).
7. **PBS**: animais infectados e tratados **a cada três dias** com **100µL** de PBS.

2.3.3.2 Comparação da eficácia terapêutica de NANO-D-AMB e Ambisome® na PCM

Visando comparar a eficácia de NANO-D-AMB com a formulação lipossomal Ambisome®, paralelamente, outro ensaio foi conduzido de forma independente iniciando-se o tratamento após 60 dias de infecção. Os animais foram infectados, como descrito anteriormente, e distribuídos nos grupos experimentais enumerados abaixo e iniciaram-se os respectivos tratamentos. Os animais foram submetidos a 30 dias de tratamento e em seguida foram eutanasiados. O experimento foi realizado uma vez, com um número de 5 camundongos por grupo.

1. **SADIOS**: animais não infectados e não tratados.
2. **AMBISOME**: animais infectados e tratados com uma dose de **6mg/kg (120 µg/100µL)** **a cada três dias** de Ambisome®.
3. **NANO-D-AMB**: animais infectados e tratados com uma dose de **6mg/kg (120 µg/100µL)** **a cada três dias** de NANO-D-AMB.

4. **PBS**: animais infectados e tratados com uma dose de **100µL a cada três dias** de PBS.

2.3.3.3 Avaliação de toxicidade in vivo de sobredoses de NANO-D-AMB e D-AMB

Neste estudo, objetivou-se verificar a indução de efeitos adversos de sobredoses de NANO-D-AMB e D-AMB. Camundongos saudáveis foram distribuídos nos grupos experimentais enumerados abaixo e submetidos a uma dose intraperitoneal dos respectivos tratamentos. A eutanásia foi realizada 3 dias após o tratamento. O experimento foi realizado três vezes de forma independente, com um número de 3 camundongos por grupo.

1. **D-AMB 1x**: animais saudáveis tratados com dose única de **6mg/kg (120µg/100µL)** de D-AMB.
2. **D-AMB 5x**: animais saudáveis tratados com dose única de **30mg/kg (600µg/500µL)** de D-AMB.
3. **NANO-D-AMB 1x**: animais saudáveis tratados com dose única de **6mg/kg (120µg/100µL)** de NANO-D-AMB.
4. **NANO-D-AMB 5x**: animais saudáveis tratados com dose única de **30mg/kg (600µg/500µL)** de NANO-D-AMB.
5. **NANO-PLGA 1x**: animais saudáveis tratados com dose única de **100µL** de NANO-PLGA.
6. **NANO-PLGA 5x**: animais saudáveis tratados com dose única de **500µL** de NANO-PLGA.
7. **PBS 1x**: animais saudáveis tratados com dose única de **100µL** de PBS.
8. **PBS 5x**: animais saudáveis tratados com dose única de **500µL** de PBS.

2.3.4 Eutanásia e coleta de tecidos

Após a finalização dos tratamentos, os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com 80 mg/kg de Cetamina e 10 mg/kg de Xilazina, e iniciou-se a coleta de tecidos e órgãos.

O sangue foi coletado a partir do plexo venoso retro-orbital e mantido a 37°C por 30 minutos até formação do coágulo. A fase líquida foi coletada e centrifugou-se a 5000 rpm por

10 minutos. O soro (aproximadamente 200 μ L) foi recolhido e mantido a -20°C para posterior dosagem de parâmetros bioquímicos de toxicidade renal e hepática.

O lavado peritoneal foi recolhido injetando-se 10 mL de PBS na cavidade peritoneal dos animais com uma seringa, e após uma massagem para despreparar as células residentes, recolheu-se todo o líquido de volta para a seringa. O lavado de todos os animais de cada grupo foi reunido em tubo cônico e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e uma alíquota de 10 μ L das células foi colocada sobre uma lâmina histológica juntamente com 10 μ L de Soro Bovino Fetal (SBF), realizando-se uma extensão celular e coloração com corante/fixador hematológico Giemsa-Wright-Metanol (ANEXO) para contagem diferencial de leucócitos.

Os dois lobos do pulmão foram retirados assepticamente e mantidos em placa de Petri contendo PBS. Coletou-se um fragmento transversal mediano de cada um dos lobos, que foram fixados em formol tamponado (ANEXO) para posterior processamento histopatológico. Apenas no experimento utilizando NANO-D-AMB e Ambisome® no tratamento da PCM murina, reuniu-se os fragmentos restantes do pulmão de todos os animais de cada grupo, que foram pesados e macerados em 2 mL de PBS estéril e mantidos em gelo. Parte do macerado foi utilizado na quantificação de Unidades Formadoras de Colônia por grama de tecido pulmonar (UFC/g). O restante do macerado foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante resultante foi armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas *in situ* por meio de ensaio imunoenzimático.

Os rins e o fígado foram retirados dos animais e mantidos em placa de Petri contendo PBS. Em um dos rins foi realizado um corte longitudinal e o outro foi deixado inteiro; coletou-se um fragmento transversal mediano do fígado; por fim, os tecidos foram fixados em formol tamponado para posterior processamento histopatológico.

No experimento utilizando diferentes doses de NANO-D-AMB em comparação a D-AMB, os dois fêmures de cada animal foram retirados e as células da medula foram removidas. As células foram centrifugadas a 2500 rpm por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. As

células foram lavadas 2 vezes com PBS e ao final ressuspensas em 1 mL de etanol a 70% gelado. As amostras de cada animal foram mantidas a -20°C até a análise.

No experimento de comparação da eficácia terapêutica de NANO-D-AMB e Ambisome®, realizou-se cultura primária de esplenócitos. O baço foi coletado assepticamente e armazenado em meio RPMI simples e mantido em gelo até posterior processamento para ensaio de linfoproliferação.

2.3.5 Quantificação de carga fúngica no tecido pulmonar

Para quantificação de carga fúngica pulmonar, o macerado do pulmão foi diluído 10 vezes em PBS. Uma alíquota de 500 µL do macerado e de cada uma das diluições foi semeada em placa contendo meio Agar BHI contendo 4% de Soro de Cavalo e 5% de Fator de Crescimento de Pb192 (SINGER-VERMES *et al.*, 1992) em duplicata (ANEXO). As placas foram mantidas a 37°C por 21 dias e após esse período a quantidade de colônias por placa foi determinada. A quantificação da carga microbiana foi determinada utilizando a seguinte fórmula:

$$UFC/g = (Cx Dx V) / P$$

C: Quantidade de colônias na placa

D: Fator da diluição

P: Peso do pulmão (g)

V: Volume plaqueado

2.3.6 Histopatologia

As amostras de pulmão, fígado e rins fixadas em formol tamponado foram encaminhadas para o Laboratório de Imunopatologia de Brasília Ltda. (LIB), Brasília/DF, onde foram processadas. Os fragmentos foram embebidos em parafina e secções seriadas de 5µm foram coradas utilizando procedimentos padrão com Hematoxilina-Eosina (HE) ou prata (Grocott) para posterior avaliação das células fúngicas por microscopia óptica.

2.3.7 Quantificação de parâmetros bioquímicos de toxicidade renal e hepática

Com a finalidade de avaliar possíveis danos no fígado e rins dos animais submetidos ao tratamento com NANO-D-AMB, foram avaliados parâmetros bioquímicos de toxicidade renal

(Uréia, Creatinina e Ácido Úrico) e hepática (Aspartato aminotransferase-AST e Alanina aminotransferase-ALT). Os soros dos animais foram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Brasília, Brasília/DF, onde foram realizadas as dosagens pelo método colorimétrico de Jaffé.

2.3.8 Análise de genotoxicidade em medula óssea por citometria de fluxo

Para avaliar possíveis efeitos genotóxicos dos tratamentos utilizados, realizou-se a avaliação de fragmentação do DNA por citometria de fluxo através de marcação com iodeto de propídio (MILNER *et al.*, 1987). O iodeto de propídio é um corante aniônico que se intercala entre os pares de bases do DNA; quanto mais material genético possui a célula, maior é a incorporação do corante. Neste ensaio, as células estudadas são lisadas, e os nucleóides liberados são marcados com iodeto de propídio e avaliados por citometria de fluxo. Dependendo da quantidade de material genético e fase de ciclo celular, obtêm-se um histograma em que os nucleóides se distribuem em picos com diferentes intensidades de fluorescência. Em células diplóides em condições saudáveis, o histograma possui dois picos: o primeiro corresponde às células na fase G0/G1 do ciclo celular, em que o conteúdo de DNA é 2n; o segundo pico com menos células corresponde àquelas que estão na fase G2/M, com 4n de material genético; uma banda entre ambos os picos corresponde a fase S. Quando eventos são detectados na região com intensidade de fluorescência abaixo da fase G1 (primeiro pico) eles são considerados nucleóides com DNA fragmentado, indicando possível genotoxicidade (BLONDIN *et al.*, 1996).

Neste estudo, as amostras de medula fixadas com etanol foram centrifugadas a 2500 rpm por 3 minutos a 4°C e as células foram lavadas duas vezes com PBS e ao final ressuspensas em um volume de 500 µL. A uma alíquota de 100 µL de cada amostra adicionou-se 200µL de tampão de lise contendo iodeto de propídeo (ANEXO). Após 30 minutos ao abrigo da luz, as amostras foram lidas em Citômetro de Fluxo (FACSCalibur™, Becton Dickson, EUA) utilizando o canal FL2 (para comprimentos de onda variando entre 560 a 580 nm). A porcentagem de fragmentação foi determinada utilizando o animal sadio não tratado como padrão. Camundongos submetidos ao tratamento com Ciclofosfamida (Genuxal®,

Baxter, Brasil) em dose única de 40 mg/kg foram sacrificados no dia seguinte ao tratamento e utilizados como controle positivo de fragmentação do DNA. Os resultados foram apresentados como porcentagem relativa de DNA fragmentado em relação aos animais saudáveis. As análises foram realizadas utilizando-se o software FlowJo versão 8.7 (Tree Star Inc, EUA, 2008). (BLONDIN *et al.*, 1996)

2.3.9 Contagem diferencial de leucócitos no lavado peritoneal

A fim de avaliar se o tratamento intraperitoneal com as formulações estudadas seria capaz de induzir recrutamento de células inflamatórias, realizou-se a contagem diferencial de leucócitos no lavado peritoneal. Após a secagem das lâminas histológicas contendo o estiramento do lavado peritoneal, incubou-se as mesmas com corante hematológico de Giemsa&Wright&Metanol por 1 minuto, e em seguida com água corrente por 3 minutos. As lâminas foram deixadas a secar e posteriormente foi realizada a visualização das células em aumento de 1000x com óleo de imersão. Contou-se um total de 100 células por lâmina, diferenciando neutrófilos, monócitos e linfócitos e determinou-se assim a porcentagem de cada tipo celular presente no lavado peritoneal.

2.3.10 Ensaio de linfoproliferação de esplenócitos

Visando avaliar o estado imunológico dos animais, realizou-se o ensaio de linfoproliferação de esplenócitos. Os baços dos animais de cada grupo foram reunidos e divididos, liberando as células presentes no tecido. Os esplenócitos foram então armazenados em meio RPMI 1640 simples (ANEXO), centrifugou-se as amostras a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C e descartou-se o sobrenadante, repetindo a lavagem mais duas vezes. Ao final as células foram ressuspensas em 1 mL/baço de RPMI suplementado para cultura de linfócitos (ANEXO) e uma diluição em 100 vezes foi feita em líquido de Türk para lise das hemácias presentes nas amostras. A concentração de linfócitos viáveis foi determinada utilizando um hemocitômetro. Plaqueou-se 5×10^5 células/poço em placas de cultura de 96 poços em triplicata, adicionando-se subsequentemente o estímulo inespecífico Concanavalina-A (Con-

A, Sigma, EUA) na concentração final de 4µg/mL ou antígenos de extrato protéico de *P. brasiliensis* na proporção 1µL para cada 500µL (EP 1:500), num volume total de 200µL/poço. (RIBEIRO, ALICE M *et al.*, 2009; RIBEIRO, ALICE MELO *et al.*, 2010)

A resposta proliferativa de células T à Concanavalina-A foi estudada pela técnica de incorporação de timidina tritiada ([H³]-timidina). Após 48 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, as amostras foram pulsadas com 1µCi/poço de timidina tritiada. A incorporação de timidina foi determinada utilizando um contador de beta-cintilação líquida. Os dados foram expressos como contagens por minutos (cpm) da incorporação de [H³]-timidina. Os sobrenadantes da cultura dos esplenócitos foram utilizados para dosagem da citocina IL-10 através do método de ELISA. (RIBEIRO, ALICE M *et al.*, 2009; RIBEIRO, ALICE MELO *et al.*, 2010)

2.3.11 Dosagem de citocinas

Considerando a importância da resposta imunológica do hospedeiro no controle da PCM, avaliou-se a presença de três citocinas: IL-12 e TNF (citocinas da resposta imune de padrão Th1, responsáveis pela resistência ao fungo) e IL-10 (citocina da resposta imune de padrão Th2, responsáveis pelo exacerbação da doença). Dessa forma, para determinar o perfil de citocinas no pulmão e na cultura de linfócitos, o sobrenadante de macerado de pulmão e o sobrenadante de cultura de esplenócitos foram utilizados na dosagem de citocinas pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay).

As citocinas quantificadas no macerado de pulmão foram IL-10, IL-12 e TNF-α, e no sobrenadante de cultura dos esplenócitos dosou-se apenas IL-10. As dosagens foram conduzidas utilizando-se kits comerciais (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA) padronizados para cada grupo de citocinas seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. O nível absoluto de citocinas (em pg/mL) presente nas amostras foi calculado com base em curva padrão fornecida com o kit comercial.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar as diferenças entre os grupos experimentais foi utilizada a análise da variância (ANOVA), seguida pelo método Bonferroni (pós-teste), realizado no programa estatístico GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, EUA, 2007). Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os gráficos e tabelas mostram os valores das replicatas \pm desvio padrão da média (SEM).

3 RESULTADOS

3.1 ENSAIOS *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos com a finalidade de responder aos seguintes questionamentos: (1) qual a concentração de NANO-D-AMB necessária para eliminar o fungo, (2) qual a concentração capaz de ocasionar hemólise e (3) se NANO-D-AMB induz menor toxicidade que D-AMB em células de mamíferos?

3.1.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) de NANO-D-AMB em leveduras de *P. brasiliensis*

Para determinar a menor concentração de NANO-D-AMB capaz de matar leveduras de *P. brasiliensis* por 24h, 72h e 7 dias foi realizado o ensaio *in vitro* de determinação da CMI. Após 24h e 72h de tratamento, foi observado que a CMI de NANO-D-AMB e de Ambisome® foi de 75 µg/mL. Após 7 dias, a CMI de NANO-D-AMB caiu para 37,5µg/mL, enquanto AMBISOME® apresentou CMI de 18,75µg/mL. Nos três tempos de tratamento, a CMI de D-AMB foi de 9,37µg/mL.

Esse resultado demonstra que o encapsulamento da anfotericina B em lipossomas ou em matriz polimérica de PLGA pode afetar seu efeito antifúngico direto, já que o fármaco encontra-se menos acessível. De qualquer modo, foi constatada a eficácia antifúngica de NANO-D-AMB *in vitro* e demonstrou-se ainda uma liberação mais lenta da anfotericina B, já que a CMI diminuiu com o tempo, enquanto a CMI de D-AMB, embora menor, permanece constante ao longo dos dias.

3.1.2 Ensaio de hemólise

Após verificar a CMI das formulações estudadas, avaliamos sua capacidade de indução de hemólise após 1h, 3h30 e 6h de tratamento. Observou-se que a formulação D-AMB foi a mais hemolítica, induzindo hemólise nos três tempos (1h, 3h30 e 6h) em concentrações de 50,

25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Figura 3**). As outras formulações testadas foram hemolíticas apenas em concentrações muito elevadas.

Esse resultado demonstra uma maior segurança na utilização de Ambisome® e NANO-D-AMB, já que mesmo em concentrações elevadas como 200 $\mu\text{g/mL}$ elas não induziram hemólise.

3.1.3 Citotoxicidade em macrófagos peritoniais pelo ensaio do MTT

Avaliando a influência dos tratamentos com D-AMB, Ambisome®, NANO-D-AMB e NANO-PLGA após 24, 48 e 72 horas na viabilidade de macrófagos peritoniais na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$, foi verificada atividade citotóxica apenas por D-AMB (**Figura 4**). Nos outros grupos não foi observada atividade citotóxica. Esse resultado demonstra uma maior segurança na utilização de Ambisome® e NANO-D-AMB, já que induziram menor citotoxicidade nos macrófagos do que D-AMB (**Figura 4**).

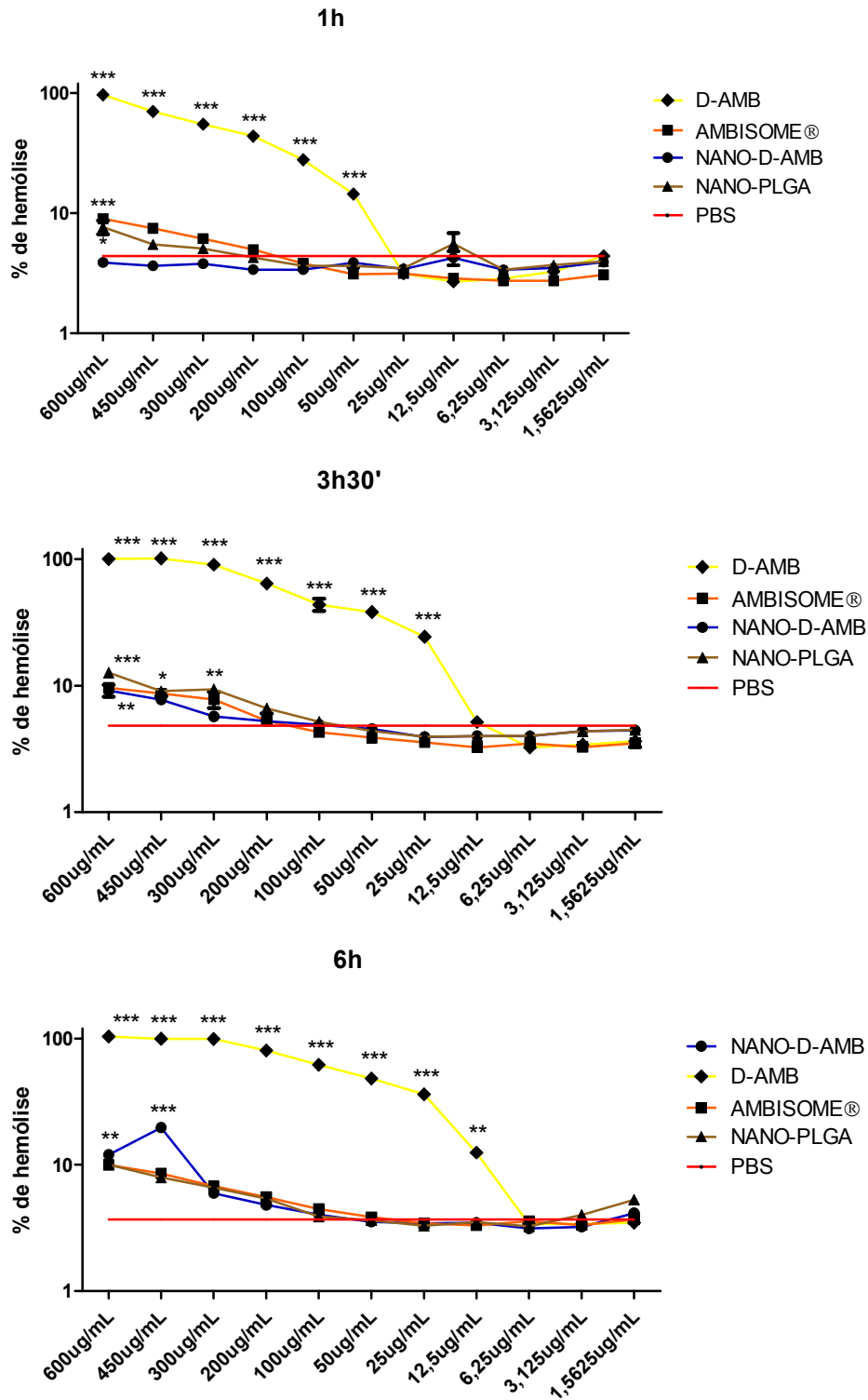


Figura 3. Porcentagem de hemólise induzida após 1h, 3h30 e 6 horas de tratamento com 600 – 1,56µg/mL de anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB), lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB). Tratamentos utilizando nanopartículas sem anfotericina B (NANO-PLGA) foram utilizados como controle. Os resultados foram expressos como a média ± SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação às amostras tratadas com PBS.

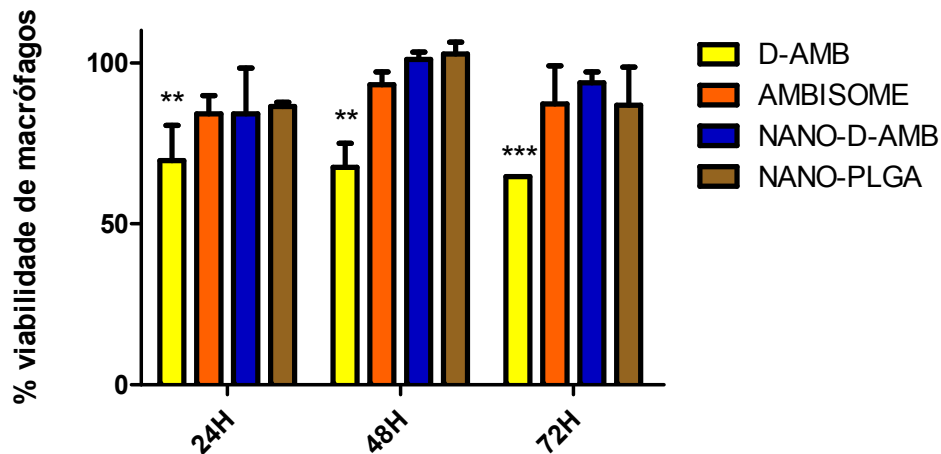


Figura 4. Porcentagem de macrófagos viáveis após 24, 48 e 72 horas de tratamento com 8 µg/mL de anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB), lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB). Tratamentos utilizando nanopartículas sem anfotericina B (NANO-PLGA) e com meio de cultura RPMI foram utilizados como controle. Os resultados foram expressos como a média ± SEM. **p<0,01 e ***p<0,001 em relação aos demais grupos.

3.2 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA NANO-D-AMB EM DIFERENTES DOSES NO TRATAMENTO DA PCM MURINA

3.2.1 Quantificação da carga fúngica pulmonar

A avaliação da atividade antifúngica das formulações estudadas foi realizada com base na quantificação de Unidades Formadoras de Colônia recuperadas por grama de tecido pulmonar (UFC/g) e avaliação histopatológica do pulmão dos camundongos. Os animais foram infectados e após 30 dias iniciaram-se os tratamentos, que tiveram duração de 60 dias. Após este período, verificou-se uma redução significativa da carga microbiana encontradas nos grupos tratados tanto com anfotericina B deoxicolato (D-AMB) quanto com a formulação nanoestruturada (NANO-D-AMB) em relação ao grupo tratado com PBS (**Figura 5**). A redução da carga fúngica foi similar nos grupos tratados com D-AMB 2mg/kg/dia (851±350 UFC/g) e com NANO-D-AMB nas doses de 6mg/kg/3dias (1541±429 UFC/g) e 4,5mg/kg/3dias (2112±119 UFC/g). A dose de NANO-D-AMB 3mg/kg/3dias (15348±1553 UFC/g) foi capaz de reduzir a carga fúngica de modo significativo em comparação ao grupo tratado com PBS

(30745±4677 UFC/g), embora não tenha alcançado a mesma eficácia de D-AMB ou da NANO-D-AMB nas outras doses. O tratamento com nanopartículas sem anfotericina (NANO-PLGA, 40000±3535 UFC/g) levou a uma carga fúngica similar a do grupo tratado apenas com PBS. O tratamento com NANO-D-AMB 1,2mg/kg/3dias não demonstrou eficácia antifúngica no primeiro experimento (dados não mostrados) e, portanto, esse grupo foi retirado dos estudos.

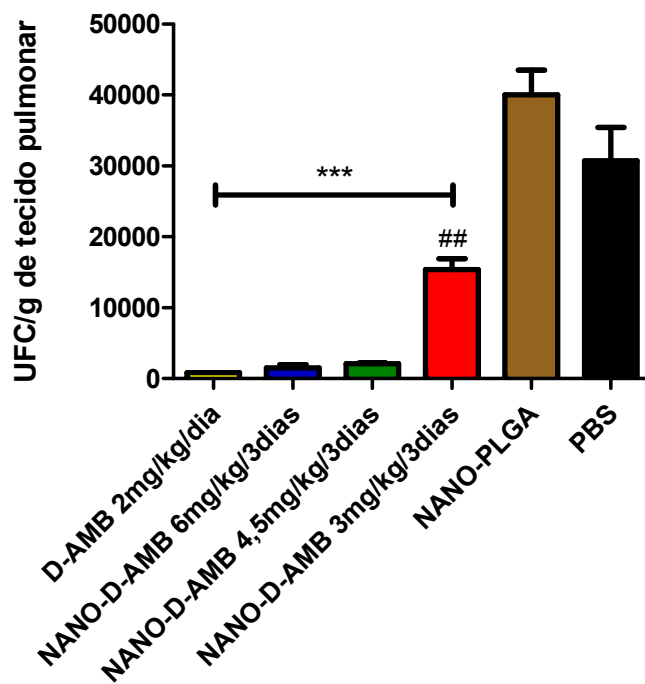


Figura 5. Quantificação de carga fúngica no tecido pulmonar em animais infectados com *P. brasiliensis* após 60 dias de tratamento com anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB) em diferentes doses. Animais tratados apenas com PBS ou com nanopartículas sem anfotericina B (NANO-PLGA) foram utilizados como controle. O resultado aponta redução de UFC/g nos animais tratados com D-AMB e NANO-D-AMB, e intensa carga fúngica pulmonar nos animais tratados com NANO-PLGA e PBS. Os resultados foram expressos como a média±SEM. ***p<0,001 em relação aos grupos NANO-PLGA e PBS. ##p<0,01 em relação aos grupos D-AMB e NANO-D-AMB 6mg/kg/3dias e 4,5mg/kg/3dias.

Para corroborar os resultados de quantificação de carga fúngica, avaliou-se a histopatologia do pulmão nos diferentes grupos. O pulmão dos animais SADIOS apresentava-se com as características histológicas típicas, ressaltando a presença de raros infiltrados inflamatórios peribrônquicos comuns nesta espécie. Também foi identificada de forma mais intensa a presença desses infiltrados nos grupos tratados com D-AMB (**Figura 6A**) e NANO-D-AMB (**Figura 6B-F**) nas três doses; no entanto, não foram observados granulomas nem

leveduras nos fragmentos analisados. Já os animais tratados com NANO-PLGA (**Figura 6G**) e PBS (**Figura 6H**) possuíam pulmões com características histopatológicas típicas da PCM murina: presença maciça de lesões granulomatosas e intenso infiltrado inflamatório comuns em estágios avançados da doença, indicando a persistência do fungo.

Desse modo, podemos concluir que os tratamentos com D-AMB e NANO-D-AMB nas doses de 6mg/kg/3dias e 4,5mg/kg/3dias apresentaram eficácia similares na redução da carga fúngica pulmonar. Além disso, o uso de NANO-D-AMB a 4,5mg/kg/3dias se apresentou como o tratamento mais vantajoso, já que: (1) permitiu a redução da quantidade de doses injetadas nos camundongos de 60 (D-AMB, uma dose a cada dia) para 20 doses (NANO-D-AMB, 1 dose a cada três dias) e ainda (2) possibilitou a diminuição em 25% da quantidade de anfotericina B injetada em relação ao grupo NANO-D-AMB 6mg/kg/3dias.

Para verificar a ocorrência de recidiva após os tratamentos com as nanopartículas, quantificou-se a carga fúngica pulmonar nos camundongos 60 dias após a última dose. Apenas foi observado crescimento de colônias nos grupos tratados com NANO-PLGA (3635 ± 129 UFC/g) e PBS (2755 ± 1244 UFC/g); sendo que nos demais grupos não houve crescimento fúngico. Dessa maneira, podemos concluir que o uso das formulações com anfotericina B mantiveram o quadro de melhoramento da doença, evitando a recidiva após o fim dos tratamentos.

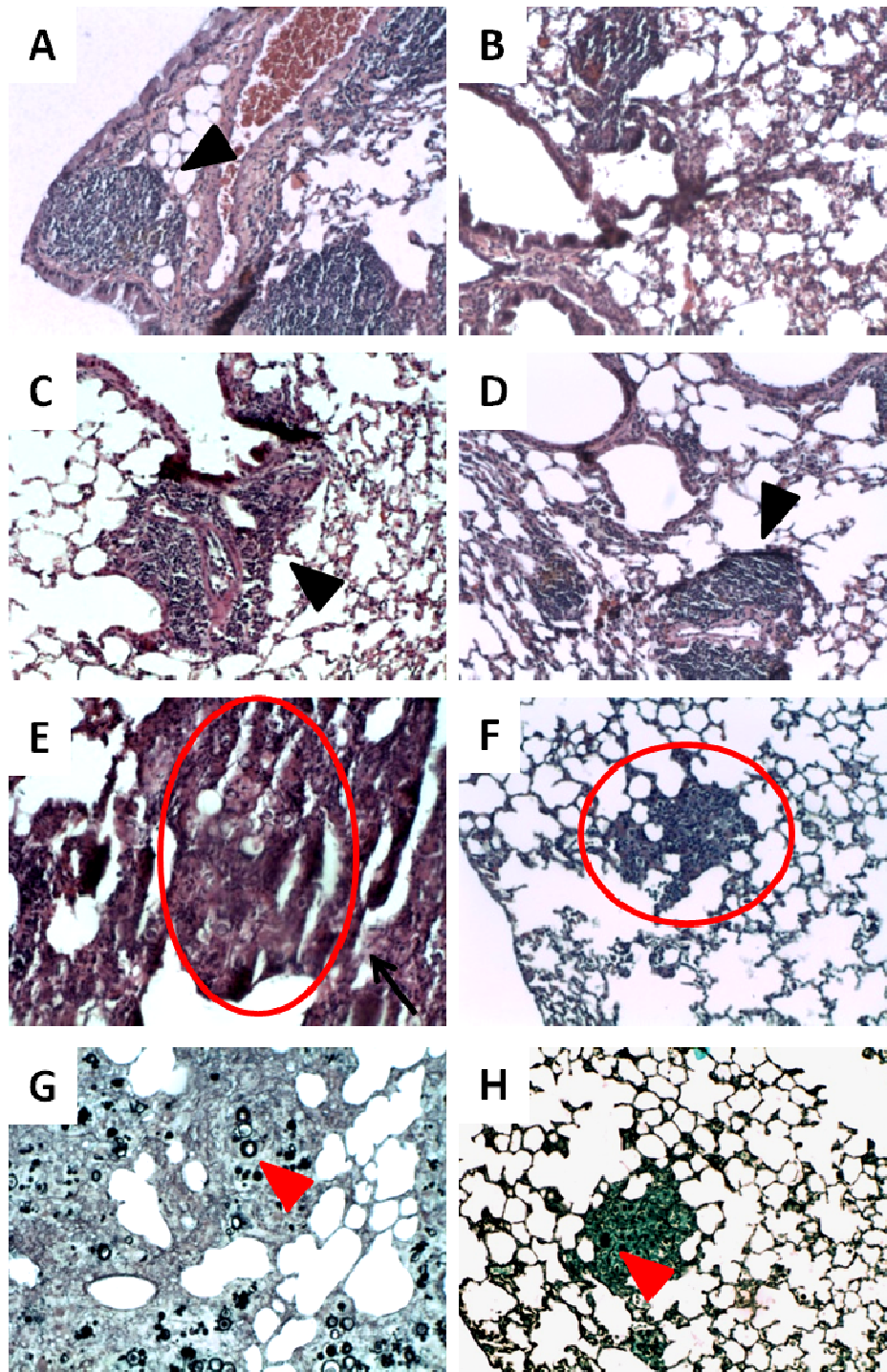


Figura 6. Fotomicrografia dos pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis* após 60 dias de tratamento com anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB, A) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB) nas doses de 6mg/kg/3dias (B), 4,5mg/kg/3dias (C) e 3mg/kg/3dias (D). Animais tratados apenas com PBS (F e H) ou com nanopartículas sem anfotericina B (NANO-PLGA, E e G) foram utilizados como controle. As setas pretas mostram infiltrados inflamatórios, e os círculos e setas vermelhas mostram respectivamente granulomas e leveduras. As imagens A-F foram coradas com HE, enquanto as imagens G-H foram coradas com prata (Grocott), todas em aumento de 100x. Verifica-se presença de infiltrados inflamatórios mononucleares focais nos animais do grupo tratados com D-AMB e NANO-D-AMB. Lesões granulomatosas e leveduras são encontradas nos grupos NANO-PLGA e PBS.

3.2.2 Avaliação de danos hepáticos e renais

A fim de verificar a indução de danos renais e hepáticos pelos tratamentos, foram realizadas as dosagens de Uréia, Ácido úrico, Creatinina, Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) séricos. Ocorreu uma diminuição dos níveis de Uréia e de Ácido úrico nos camundongos dos grupos NANO-D-AMB 4,5mg/kg/3dias e 3mg/kg/3dias, NANO-PLGA e PBS (**Tabela 1**). A produção de Creatinina também foi reduzida nos grupos NANO-PLGA e PBS (**Tabela 1**). Não foram observadas diferenças significativas quanto à medida das enzimas AST e ALT (**Tabela 1**). Por fim, não foi observada nenhuma alteração histopatológica nesses tecidos em nenhum dos grupos estudados.

Tabela 1. Níveis de Uréia, Creatinina, Ácido úrico, AST e ALT em animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com diferentes formulações de anfotericina B.

GRUPOS	URÉIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)
SADIOS	64,80±2,13	0,44±0,02	3,64±0,22	106,2±5,36	14,60±1,50
D-AMB 2mg/kg/dia	73,67±2,60	0,40±0,00	3,40±0,20	108,7±2,02	17,00±1,00
NANO-D-AMB 6mg/kg/3dias	57,75±1,88	0,45±0,02	2,97±0,06	107,0±7,72	19,75±2,86
NANO-D-AMB 4,5mg/kg/3dias	50,25±2,49**	0,40±0,00	2,75±0,17*	116,0±5,46	29,00±5,58
NANO-D-AMB 3mg/kg/3dias	51,25±1,49*	0,40±0,00	2,175±0,12***	114,0±19,85	23,50±4,51
NANO-PLGA	49,00±1,49*	0,30±00**	2,15±0,45**	91,50±4,50	12,00±2,00
PBS	49,20±3,42**	0,30±00***	1,84±0,10***	131,8±9,98	20,80±3,72

Os resultados foram expressos como a média ± SEM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo SADIOS.

3.2.3 Genotoxicidade em células de medula óssea

A capacidade dos tratamentos em induzir fragmentação de DNA nas células totais da medula óssea foi avaliada através da marcação com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo. Não foram encontradas diferenças significativas na quantidade de DNA fragmentado

dentre os grupos, sugerindo não ocorrer indução de genotoxicidade pelos tratamentos (Figura 7).

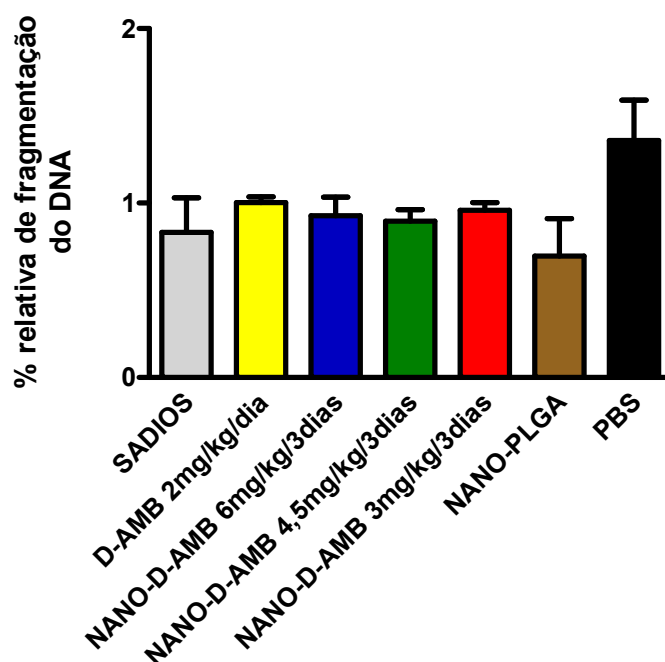


Figura 7. Porcentagem relativa de fragmentação do DNA em animais infectados com *P. brasiliensis* após 60 dias de tratamento com anfotericina B deoxicolato de sódio na forma livre (D-AMB) ou nanoestruturada (NANO-D-AMB) em diferentes doses. Animais não infectados (SADIOS) ou infectados e tratados com PBS (PBS) ou com nanopartículas sem anfotericina B (NANO-PLGA) foram utilizados como controle. Não foram observadas diferenças significativas dentro dos grupos. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM.

3.3 COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DE AMBISOME® E NANO-D-AMB NO TRATAMENTO DA PCM

3.3.1 Quantificação da carga fúngica pulmonar

Para comparar a eficácia antifúngica de Ambisome® e da formulação nanoestruturada proposta neste trabalho, quantificou-se as unidades formadoras de colônia recuperadas dos pulmões de animais infectados por *P. brasiliensis* e tratados por 30 dias com os fármacos na dose de 6mg/kg/3dias, além de análise histopatológica.

Tanto o tratamento com Ambisome® (670 \pm 78 UFC/g) quanto com NANO-D-AMB (1101 \pm 245 UFC/g) foram capazes de reduzir de modo similar a carga fúngica dos pulmões em

mais de 20 vezes em relação à encontrada nos animais cujo tratamento se deu apenas com PBS (28026±1096 UFC/g), como mostra a **Figura 8**.

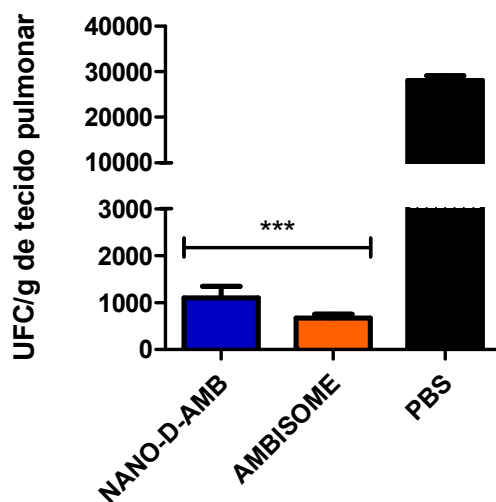


Figura 8. Quantificação de carga fúngica no tecido pulmonar recuperadas em camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com anfotericina B lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB). Camundongos tratados com PBS foram utilizados como controle. Os grupos NANO-D-AMB e AMBISOME apresentaram cargas fúngicas similares e significativamente menores que o grupo PBS. Os dados estão representados como Média e Erro Padrão da Média; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo PBS.

Em todos os grupos foram encontrados infiltrados inflamatórios peribrônquicos (**Figura 9**), sendo que nos grupos NANO-D-AMB e AMBISOME não foi detectada presença de granulomas nem leveduras, enquanto no grupo PBS, foram encontradas inúmeras lesões granulomatosas com presença de fungos em seu interior, evidenciando a persistência do patógeno no tecido.

Desse modo, é possível concluir através na quantificação de carga fúngica e da análise histopatológica, que os animais tratados com Ambisome® e NANO-D-AMB apresentaram menor carga fúngica pulmonar, com menor comprometimento do tecido pulmonar em comparação aos animais do grupo PBS.

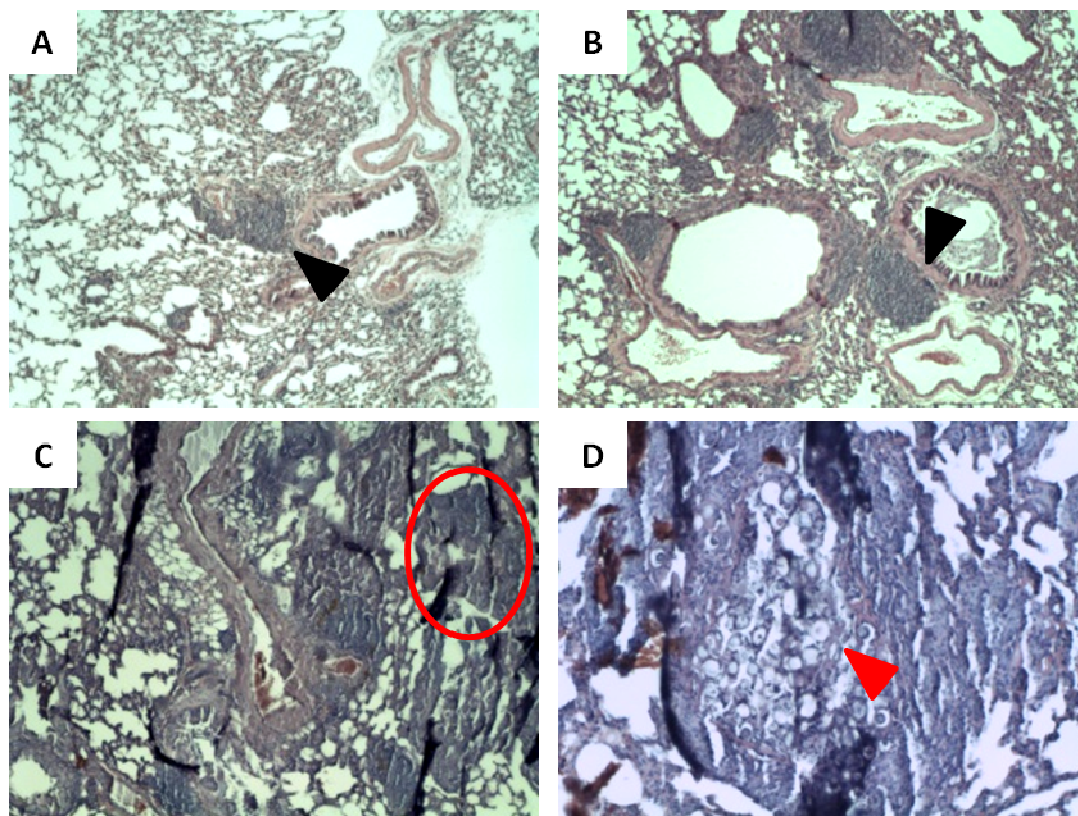


Figura 9. Fotomicrografia dos pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis* após 30 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal (AMBISOME, A) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB, B). Animais tratados apenas com PBS (C-D) foram utilizados como controle. As setas pretas mostram infiltrados inflamatórios, e os círculos e setas vermelhas mostram respectivamente granulomas e leveduras. Todos os cortes foram corados com HE; A-C estão em aumento de 40x, enquanto D está em aumento de 100x. Verifica-se presença de infiltrados inflamatórios mononucleares focais nos animais dos grupos AMBISOME e NANO-D-AMB. Lesões granulomatosas e leveduras são massivamente encontradas no grupo PBS.

3.3.2 Avaliação da resposta imunológica após os tratamentos

Para avaliar se os tratamentos utilizados neste estudo eram capazes de influenciar a resposta imunológica dos camundongos e com isso auxiliar a resolução da doença, foi realizada a dosagem de citocinas no pulmão, além da quantificação da capacidade de proliferação celular de esplenócitos. Foi observada uma produção elevada de IL-12 nos animais tratados com NANO-D-AMB (**Figura 10A**) e de TNF (**Figura 10B**) no grupo AMBISOME, enquanto não houve diferença na produção de IL-10 entre os grupos (**Figura 10C**).

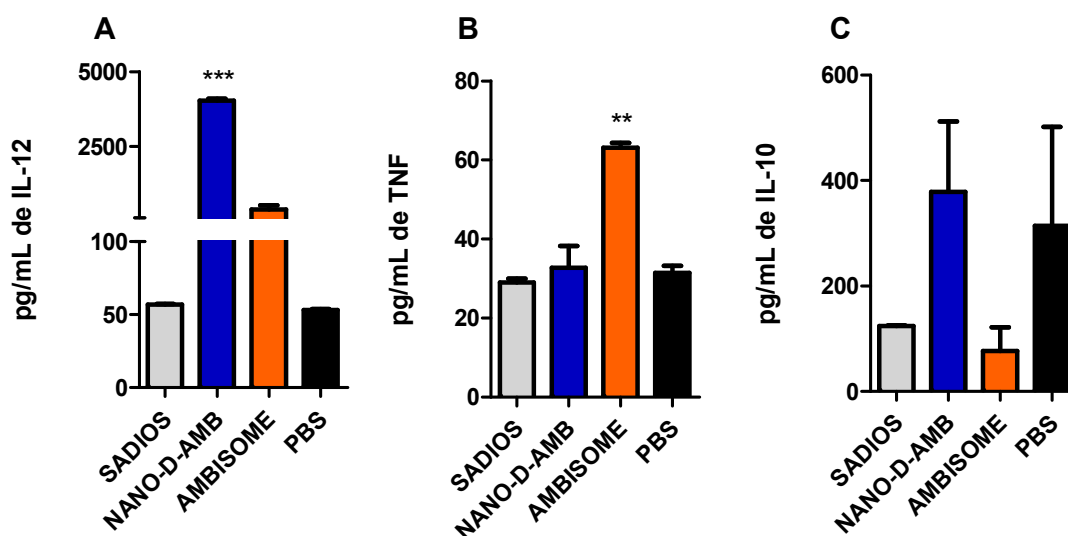


Figura 10. Quantificação por ELISA de IL-12, IL-10 e TNF no macerado de pulmão em camundongos infectados com *P. brasiliensis* após 30 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB). Animais não infectados (SADIOS) ou infectados e tratados com PBS foram utilizados como controle. Observou-se elevada produção de IL-12 no grupo NANO-D-AMB e de TNF e no grupo AMBISOME. Não houve diferenças nos níveis de IL-10 dentre os grupos. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo SADIOS.

No ensaio de linfoproliferação, tanto nas amostras não estimuladas quanto nas estimuladas com Concanavalina-A (mitógeno inespecífico) e Extrato Proteico de *P. brasiliensis* (resposta antígeno-específica) foi observada uma diminuição considerável na capacidade proliferativa dos esplenócitos no grupo tratado com PBS, enquanto os tratamentos com Ambisome® e NANO-D-AMB pareceram recuperar essa função, ainda que parcialmente, comparando-se com os animais sadios (**Figura 11**). Não houve diferença na produção de IL-10 por estes linfócitos em nenhum dos grupos (dados não apresentados).

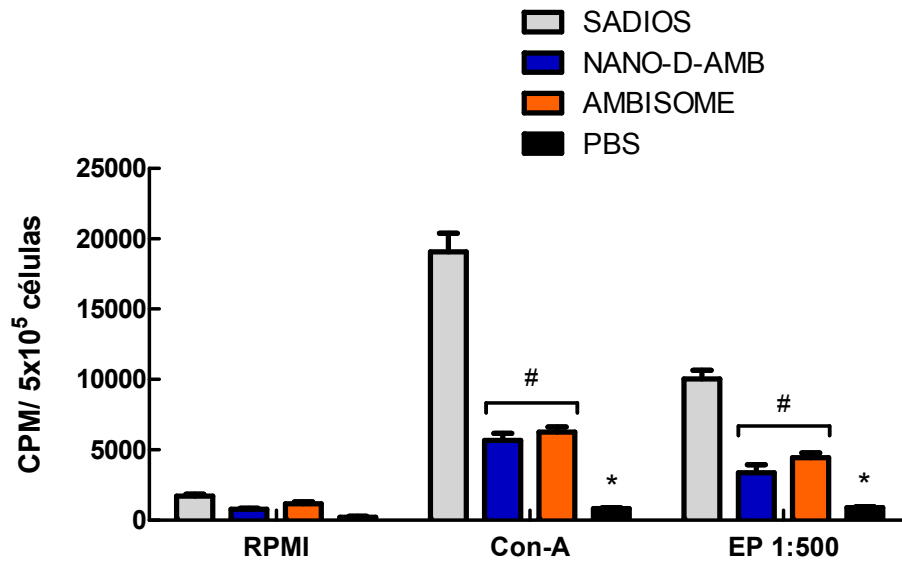


Figura 11. Quantificação da capacidade linfoproliferativa de esplenócitos em camundongos infectados com *P. brasiliensis* após 30 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal (AMBISOME) ou nanoestruturada em PLGA (NANO-D-AMB). Animais não infectados (SADIOS) ou infectados e tratados com PBS foram utilizados como controle. Os esplenócitos foram tratados com Concanavalina-A a 4 μ g/mL (Con-A) ou Extrato Protéico de *P. brasiliensis* na proporção de 1/500 (EP 1:500). Os resultados foram expressos como a média \pm SEM. * $p < 0,5$ em relação aos grupos AMBISOME e NANO-D-AMB. # $p < 0,001$ em relação ao grupo SADIOS.

Os resultados de dosagem de citocinas no pulmão e linfoproliferação demonstram que os tratamentos com Ambisome® e NANO-D-AMB restabeleceram parcialmente a imunidade celular que é reprimida pela persistência de *P. brasiliensis* no hospedeiro, o que não foi observado no grupo PBS.

3.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE *IN VIVO*

Para determinar a capacidade de indução de toxicidade aguda de NANO-D-AMB, camundongos sadios foram tratados com uma superdosagem das formulações contendo anfotericina B. Os animais foram tratados com uma dose única de 6mg/kg (1x) ou 30mg/kg (5x), e após 3 dias foram sacrificados.

3.4.1 Avaliação de danos hepáticos e renais

A fim de verificar possíveis danos hepáticos e renais induzidos pelos tratamentos, foi realizada análise histopatológica de pulmão, rins e fígado e quantificação de parâmetros bioquímicos no soro. Na avaliação histopatológica, não foram observadas alterações morfológicas e estruturais no pulmão, rins e fígado em nenhum dos grupos (**Figura 12A-D**). No entanto, apareceram pequenos infiltrados inflamatórios com presença de polimorfonucleares e linfócitos nos fígados dos animais tratados com NANO-PLGA 1x (**Figura 12C**) e com maior intensidade nos grupos NANO-D-AMB 5x (**Figura 12B**) e NANO-PLGA 5x (**Figura 12C**). A quantificação dos parâmetros bioquímicos no soro evidenciou apenas uma diminuição do Ácido úrico no grupo NANO-PLGA 5x (**Tabela 2**), sendo que não foram observadas alterações quanto aos outros parâmetros.

Desse modo é possível concluir que não houve indução de alterações estruturais nem prejuízo das funções renais e hepáticas, apesar da diminuição do ácido úrico no grupo NANO-PLGA 5x e do aparecimento dos infiltrados inflamatórios no fígado dos animais tratados com NANO-PLGA.

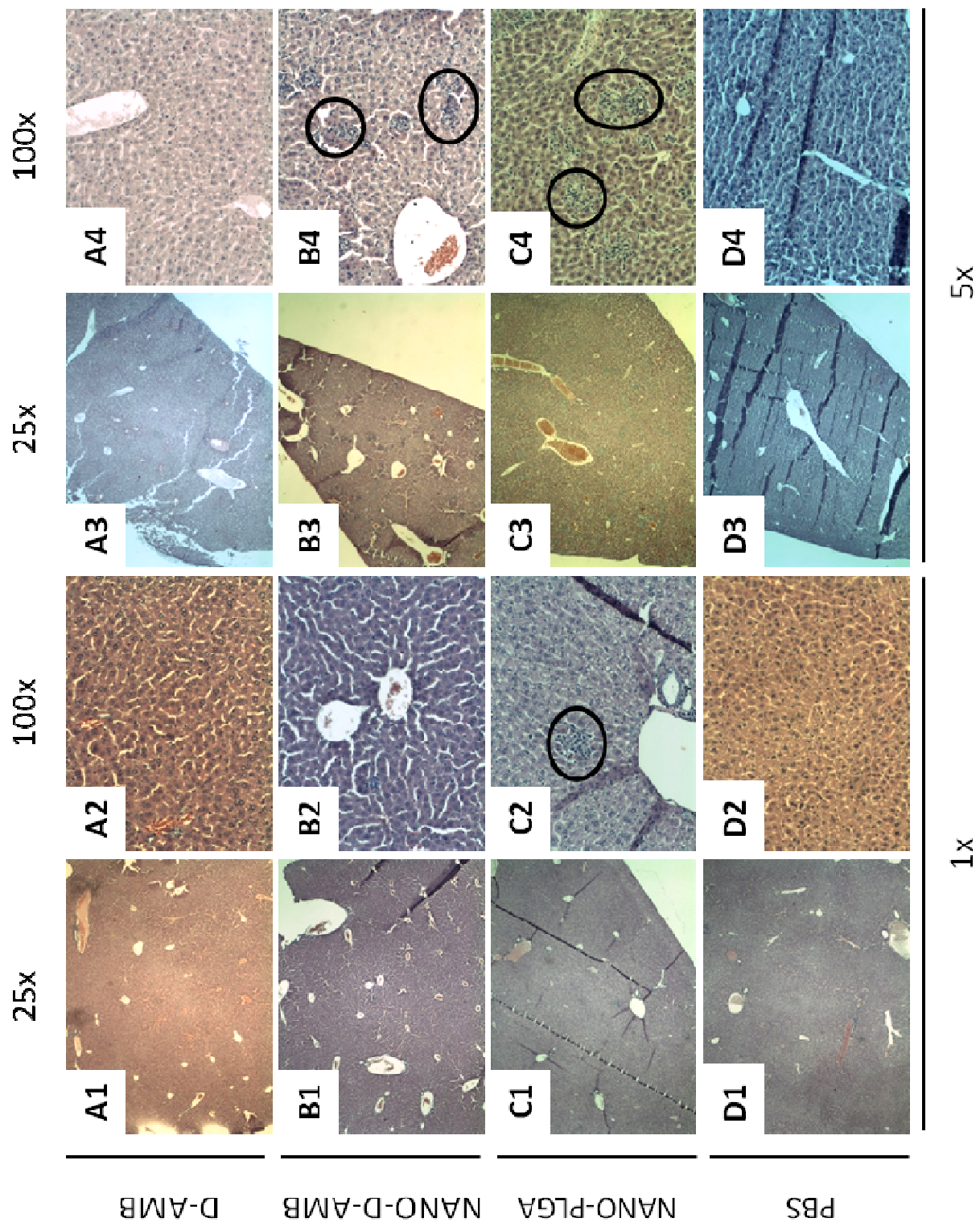


Figura 12. Fotomicrografia dos fígados de animais saudáveis 3 dias após tratamento com D-AMB (A), NANO-D-AMB (B) e NANO-PLGA (C) nas doses de 6mg/kg (1x) ou 30mg/kg (5x). Animais tratados apenas com 100 μ L (1x) ou 500 μ L de PBS (D) foram utilizados como controle. Os círculos pretos mostram infiltrados inflamatórios. Todos os cortes foram corados com HE; 25x, 40x, 100x e 400x identificam os aumentos em que as imagens são visualizadas em cada coluna. Verifica-se presença de pequenos infiltrados inflamatórios com neutrófilos e linfócitos nos animais dos grupos NANO-D-AMB 5x e NANO-PLGA 1x e 5x.

Tabela 2. Níveis de Uréia, Creatinina, Ácido úrico, AST e ALT em animais sadios 3 dias após tratamento com D-AMB, NANO-D-AMB e NANO-PLGA nas doses de indicadas.

GRUPOS	URÉIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)
PBS 1x	69,13±3,16	0,43±0,03	2,75±0,14	97,25±13,63	15,14±3,15
D-AMB 1x	71,22±5,52	0,41±0,01	2,57±0,19	111,00±17,41	20,43±12,28
NANO-D-AMB 1x	66,33±4,163	0,37±0,02	2,64±0,19	98,56±8,39	27,44±8,15
NANO-PLGA 1x	62,56±7,20	0,44±0,04	2,52±0,24	84,89±14,06	23,33±4,33
PBS 5x	54,89±3,32	0,43±0,01	2,35±0,12	86,56±7,68	22,44±0,81
D-AMB 5x	55,56±1,84	0,50±0,02	2,50±0,14	83,22±7,69	22,22±2,13
NANO-D-AMB 5x	68,13±4,17	0,38±0,01	2,54±0,16	82,63±5,30	23,75±2,10
NANO-PLGA 5x	58,40±2,15	0,38±0,02	1,62±0,12**	58,80±6,56	12,20±1,98

Os resultados foram expressos como a média ± SEM. **p<0,01 em relação ao grupo SADIOS.

3.4.2 Contagem diferencial de células inflamatórias no peritônio

Para avaliar a indução de processo inflamatório pelo tratamento usando as sobredoses das formulações testadas, quantificaram-se os leucócitos presentes no lavado peritoneal dos camundongos no terceiro dia após o tratamento. Foi observado um aumento considerável do número de neutrófilos e redução no número de linfócitos no grupo tratado com D-AMB 5x (**Figura 13**). Nos demais grupos não foram verificadas diferenças na população de leucócitos.

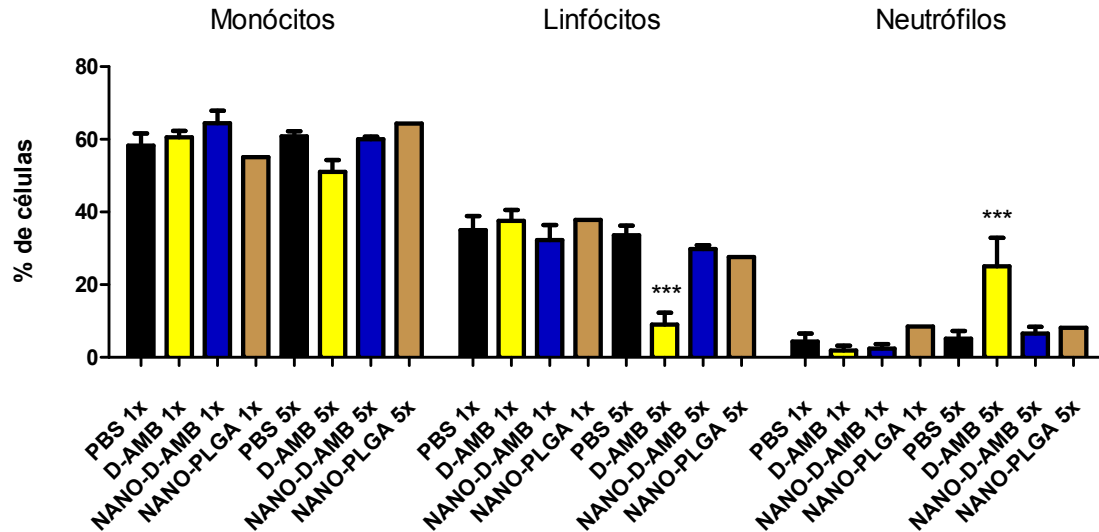


Figura 13. Contagem diferencial de leucócitos peritoneais em animais sadios 3 dias após tratamento com D-AMB, NANO-D-AMB e NANO-PLGA nas doses de 6mg/kg (1x) ou 30mg/kg (5x). Animais tratados apenas com 100 μ L (1x) ou 500 μ L (5x) de PBS foram utilizados como controle. O grupo D-AMB 5x apresentou um número elevado de neutrófilos e diminuição do número de linfócitos, enquanto nos demais grupos não foi verificada diferença na presença de leucócitos. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo SADIOS.

3.4.3 Genotoxicidade em células de medula óssea

A avaliação de danos ao DNA foi realizada através de citometria de fluxo pela marcação com iodeto de propídeo. A Ciclofosfamida é um fármaco genotóxico e foi utilizada aqui como controle, e os animais que receberam este tratamento apresentaram elevado índice de fragmentação do DNA (**Figura 14**). Nos demais tratamentos, não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de DNA fragmentado, demonstrando que não são genotóxicos (**Figura 14**).

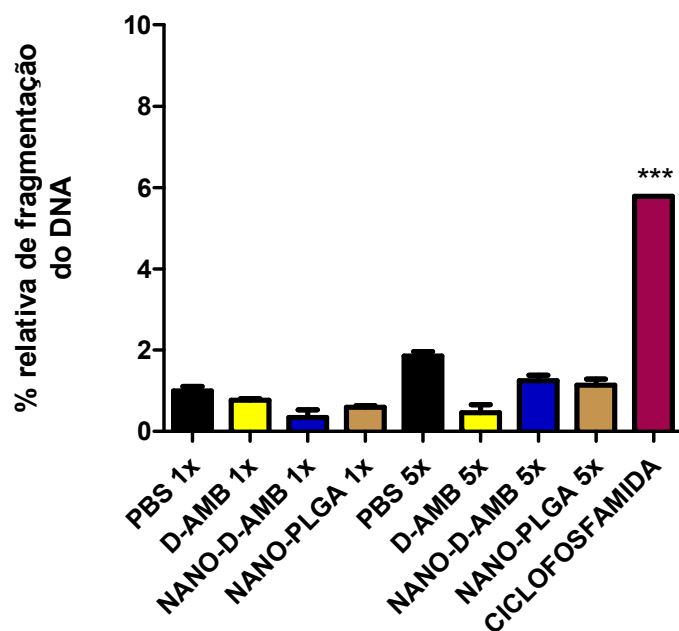


Figura 14. Porcentagem relativa de fragmentação do DNA em animais saudáveis 3 dias após tratamento com D-AMB, NANO-D-AMB e NANO-PLGA nas doses de 6mg/kg (1x) ou 30mg/kg (5x). Animais tratados apenas com 100 μ L (1x) ou 500 μ L (5x) de PBS e Ciclofosfâmida a 40 mg/kg foram utilizados como controle. Não foram observadas diferenças entre a porcentagem de DNA fragmentado dentre os grupos, com exceção dos animais tratados com Ciclofosfâmida, que apresentaram elevado índice de dano genético. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM. *** p <0,001 em relação aos demais grupos.

4 DISCUSSÃO

Doenças fúngicas invasivas representam um problema de saúde grave e crescente e são a principal causa de morte no mundo (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002), sendo os fungos a quarta causa de infecções em pacientes hospitalizados (PAULO *et al.*, 2010; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). O manejo das doenças fúngicas é um grande desafio que vem estimulando clínicos a adotarem diversas estratégias, profiláticas e empíricas, na administração de agentes antifúngicos (PAUW, 2011). A falta de um rápido diagnóstico, as opções terapêuticas limitadas devido à toxicidade, eficácia restrita, custos e resistência clínica, além da impossibilidade de controlar os fatores de predisposição, como a imunossupressão, são exemplos das dificuldades encontradas durante o combate a estas infecções (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006; PAUW, 2011). O aumento dramático na incidência de micoses invasivas e severas devido a maior vulnerabilidade de pacientes imunossuprimidos, ao desenvolvimento de resistência fúngica aos azóis associada ao seu uso profilático, além da impossibilidade de administrar-se doses adequadas de anfotericina B por sua baixa tolerabilidade motivam a procura por novos fármacos e novas formulações de medicamentos pré-existentes de modo a aperfeiçoar a janela terapêutica e diminuir os riscos e seqüelas (PAUW, 2011).

Embora os fungos venham chamando cada vez mais a atenção na investigação biomédica, as pesquisas se concentram em fungos causadores de doenças em países de primeiro mundo, como a *Candida albicans*, enquanto outros fungos que predominam nos países em desenvolvimento são negligenciados (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002). Um deles é o *Paracoccidioides brasiliensis*, causador de uma das micoses sistêmicas mais prevalentes no Brasil e em toda a América Latina, a paracoccidioidomicose (PCM) (MARTINEZ, 2010). Esta micose foi recentemente incluída na lista de doenças tropicais negligenciadas, e seu impacto na saúde pública ainda não é bem conhecido devido à falta de levantamentos estatísticos (HOTEZ *et al.*, 2008; MARTINEZ, 2010). O tratamento da PCM se dá através de uma série de medicamentos: sulfanamidas (incluindo co-trimoxazol), cetoconazol e derivados triazólicos

(itraconazol, fluconazol, voriconazol) e a anfotericina B deoxicolato (FERREIRA, M. S., 2009). A anfotericina B deoxicolato (D-AMB) costuma ser utilizada nos casos mais severos, como terapia endovenosa inicial até a remissão da doença, quando o paciente é transferido para a fase de manutenção com a administração de drogas orais (FERREIRA, M. S., 2009).

Desde sua introdução em 1959, a anfotericina B deoxicolato (D-AMB) tem sido uma droga revolucionária, com inquestionável eficácia antifúngica, mas também com comprovada toxicidade (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2003). Apesar da introdução subsequente de outros agentes antifúngicos, D-AMB permanece como tratamento de escolha para diversas infecções fúngicas graves em hospedeiros vulneráveis, devido a seu amplo espectro de ação e a baixa frequência de resistência (GALLIS *et al.*, [S.d.]; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2003; VANDEN BOSSCHE *et al.*, 1998). No entanto, a tolerância problemática a este fármaco, que inclui efeitos adversos relacionados à perfusão e a toxicidade renal, torna-se um grande obstáculo em seu uso e limita suas aplicações clínicas (THORNTON; WASAN, 2009). Para amenizar os problemas com o uso de D-AMB, a nanoestruturação desse fármaco vem sendo intensamente estudada, demonstrando a capacidade de potencializar o efeito da droga e reduzir sua toxicidade. Algumas preparações lipídicas de anfotericina B melhoraram a toxicidade associada e se mostraram tão eficazes quanto a formulação padrão de D-AMB; no entanto, essas formulações são de alto custo e isso restringe seu uso generalizado (GULLO, 2009; PAUW, 2011; THORNTON; WASAN, 2009). A nanoestruturação com polímeros biodegradáveis também tem sido uma abordagem bastante explorada, em especial utilizando o PLGA como componente da matriz polimérica, por promover uma liberação sustentada do fármaco e assim reduzir o número de aplicações a que o paciente é submetido (DERAY *et al.*, 2002; DU *et al.*, 2006). Além disso, já foi demonstrado que nanopartículas de PLGA são endocitadas e assim podem eficientemente realizar a liberação intracelular do fármaco (ZHANG *et al.*, 2007).

O primeiro trabalho utilizando nanopartículas com atividade antifúngica contra *P. brasiliensis* e seu uso terapêutico durante a PCM experimental foi conduzido por Amaral *et al.* em 2009. A nanoestruturação em polímeros de PLGA (NANO-D-AMB) teve como objetivo promover uma liberação sustentada deste fármaco, de modo que uma dose administrada de

NANO-D-AMB (120 μ g/100 μ L, correspondendo a 6mg/kg em camundongo BALB/c) possuía uma quantidade três vezes maior do que a dose administrada de D-AMB (40 μ g/100 μ L, que corresponde a 2mg/kg em camundongo BALB/c). Isso permitiu uma redução do número de aplicações em três vezes, já que as injeções eram realizadas uma vez a cada três dias para os animais tratados com NANO-D-AMB, enquanto a administração de D-AMB era diária. No estudo de Amaral *et al.* (2009) foi demonstrado que NANO-D-AMB apresentou eficácia antifúngica similar à de D-AMB e, embora a maior quantidade de anfotericina B administrada, a segurança terapêutica foi mantida sem a indução de efeitos adversos.

A formulação de anfotericina B deoxicolato nanoestruturada utilizada no presente trabalho é a mesma do estudo por Amaral *et al.* em 2009. Nos ensaios *in vitro* foi demonstrado que a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de NANO-D-AMB e de Ambisome® em leveduras de *P. brasiliensis* foi de 75 μ g/mL durante os 3 primeiros dias de cultivo, e caiu para respectivamente 37,5 μ g/mL e 18,75 μ g/mL no sétimo dia. Enquanto isso, a CMI de D-AMB manteve-se constante (9,37 μ g/mL) nos três tempos analisados. Este resultado demonstra a liberação mais lenta do agente antifúngico em NANO-D-AMB (KOHANE *et al.*, 2006) em meio de cultura, e ainda, que a nanoestruturação da anfotericina B nos lipossomas ou na mistura polimérica torna seu acesso às leveduras mais difícil (DUPONT, 2002; ESPUELAS *et al.*, 2003; GONZÁLEZ, G. M. *et al.*, 2004). Desse modo, faz-se necessário um maior tempo de contato ou uma maior concentração das nanoformulações para alcançarem a mesma capacidade antifúngica que D-AMB. Estudos sobre o perfil de liberação da anfotericina B na NANO-D-AMB estão sendo conduzidos e poderão elucidar melhor sua cinética de dissociação da matriz polimérica.

Após a injeção peritoneal, as nanopartículas podem ser drenadas pelos ductos linfáticos e então podem cair na circulação sanguínea (TSAI *et al.*, 2007), simulando um tratamento endovenoso (VEN *et al.*, 2012). Por isso, o estudo da hemólise e da citotoxicidade *in vitro* são um importante parâmetro para deduzir a toxicidade da perfusão (VEN *et al.*, 2012). Neste estudo foi possível constatar a maior capacidade hemolítica e maior citotoxicidade de D-AMB em relação às demais formulações (VEN *et al.*, 2012). Isso pode ser explicado pelo fato de D-

AMB rapidamente se dissociar em deoxicolato e anfotericina B quando em meio aquoso, formando monômeros e oligômeros. Os oligômeros possuem grande afinidade pelo colesterol, e assim causam danos em membranas celulares de mamíferos (BRAJTBURG; BOLARD, 1996; GOLENSER; DOMB, 2006; TORRADO *et al.*, 2008; VEN *et al.*, 2012). Enquanto isso, Ambisome® e NANO-D-AMB são estáveis em meio aquoso, liberando gradualmente pequenas quantidades de anfotericina B, na maior parte monomérica (BRAJTBURG; BOLARD, 1996; LEGRAND *et al.*, 1997; TORRADO *et al.*, 2008; VEN *et al.*, 2012). Certamente, a liberação mais lenta dos monômeros de anfotericina B em lipossomas ou nanopartículas poliméricas pode justificar a ocorrência de uma menor indução de hemólise e citotoxicidade em macrófagos dos nanofármacos, enquanto D-AMB mostra-se menos segura, como já foi demonstrado em outros trabalhos (DUNCAN, R *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2008; VEN *et al.*, 2012).

Nossos resultados *in vivo* demonstram que é possível reduzir a quantidade de anfotericina B administrada em 25%, já que camundongos tratados com uma dose de 4,5 mg/kg/3dias de NANO-D-AMB apresentaram redução da carga fúngica similar à de animais tratados com NANO-D-AMB a 6mg/kg/3dias e D-AMB 2mg/kg/dia. Isso pode ser devido à interiorização das nanopartículas por células fagocíticas, que após a captura acabam servindo como um reservatório secundário para a liberação lenta da anfotericina B na circulação, e assim, prolongar seus efeitos (LEMKE *et al.*, 2005; VEN *et al.*, 2012; VYAS; GUPTA, S., 2006). Além disso, considerando que *P. brasiliensis* pode infectar fagócitos (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002), a interiorização das nanopartículas poderia amplificar sua atividade perante as leveduras existentes dentro destas células (GUO, L. S., 2001; LEMKE *et al.*, 2005). Alguns relatos afirmam que formulações coloidais são mais facilmente internalizadas do que a formulação livre de anfotericina B deoxicolato (LEGRAND; BOLARD, 1996; VEN *et al.*, 2012), demonstrando que a fagocitose das nanopartículas pode ser uma grande aliada na ampliação de sua atividade antifúngica.

Neste estudo, os tratamentos com D-AMB, NANO-D-AMB e Ambisome® não foram capazes de eliminar completamente a presença do fungo nos pulmões dos animais, mas foram capazes de reduzir significativamente a carga fúngica como comprovam os valores da contagem

de leveduras viáveis no tecido pulmonar. Embora os granulomas sejam importantes estruturas que promovem a contenção da proliferação de *P. brasiliensis* e amenizam sua disseminação no hospedeiro (CAMARGO, DE; FRANCO, DE, 2000; FORTES *et al.*, 2011), eles também podem dificultar o acesso pelas nanopartículas, tanto em animais tratados com a nanoformulação quanto com o fármaco livre (AMARAL, A C *et al.*, 2009). A presença de infiltrados inflamatórios peribrônquicos nesses grupos pode ser indício da presença de componentes fúngicos e leveduras em pequenas quantidades (GONZÁLEZ, A.; LENZI, HENRIQUE LEONEL; *et al.*, 2008). Já a presença de granulomas bem definidos e os altos níveis de carga microbiana demonstram a persistência de *P. brasiliensis* nos pulmões dos animais tratados com NANO-PLGA e PBS (CAMARGO, DE; FRANCO, DE, 2000; GONZÁLEZ, A.; LENZI, HENRIQUE LEONEL; *et al.*, 2008; LINARES; FRIEDMAN, 1972). É importante citar que, após 60 dias da interrupção dos tratamentos, não houve crescimento de colônias nos grupos tratados com as nanoformulações, indicando a não ocorrência de recidiva, que costuma ser comum em pacientes tratados com anfotericina B deoxicolato (SCAVONE; BURGER, EVA, 2004).

Na análise histopatológica, não foram identificadas alterações morfológicas estruturais indicadoras de toxicidade aguda ou crônica nos tecidos renal e hepático, tanto dos animais infectados e tratados pelas formulações propostas, bem como nos tratamentos de animais saudáveis com sobredoses. No entanto, é intrigante o achado de pequenos infiltrados inflamatórios nos fígados dos animais tratados com NANO-PLGA (1x e 5x) e na sobredose com NANO-D-AMB 5x. Isso poderia ser devido a uma ação pro-inflamatória dessas nanopartículas, mas apenas um trabalho demonstra a imunomodulação do sistema imunológico por micropartículas de PLGA (NICOLETE *et al.*, 2011), e ainda não existem relatos dessa característica imunomodulatória *in vivo*. É importante citar que o tratamento prolongado com essas nanopartículas, realizado neste trabalho durante 60 dias na dose que seria correspondente à 1x (vide páginas 28 e 43), não levou à ocorrência desses infiltrados inflamatórios, indicando ser uma reação aguda. De qualquer modo, essa característica deve ser estudada de forma mais profunda, já que pode representar um importante efeito adjuvante desta formulação.

Um dos sintomas subagudos do tratamento com anfotericina B é o aumento de creatinina e uréia sérica em decorrência do prejuízo da função renal (BURGES; BIRCHALL, 1972; LEMKE *et al.*, 2005). No entanto, neste estudo, foram verificadas hipouremia e hipouricemia nos animais infectados e tratados de forma prolongada com NANO-D-AMB a 4,5 e 3mg/kg/3dias, NANO-PLGA e PBS, além de níveis reduzidos de creatinina nos grupos NANO-PLGA e PBS. Além disso, ocorreu uma diminuição nos níveis de ácido úrico encontrada nos animais tratados com NANO-PLGA 5x. As alterações bioquímicas encontradas possivelmente não estão relacionadas com as formulações de anfotericina B, já que animais tratados com NANO-PLGA e PBS também apresentaram estas alterações. Os níveis de AST e ALT não foram alterados em nenhum dos experimentos, indicando não haver prejuízo da função hepática diante do tratamento com as formulações testadas (KLEINBERG, 2006).

Neste trabalho, não foi observada indução de danos ao material genético em células da medula óssea em decorrência do uso de NANO-D-AMB e NANO-PLGA, tanto de forma prolongada em animais infectados, quanto aguda em sobredoses, já que os níveis de DNA fragmentado foram similares aos dos animais SADIOS. Esse resultado corrobora com estudos na literatura que demonstram não haver genotoxicidade induzida nem pela anfotericina B nem pelo PLGA em modelos experimentais (GABLER *et al.*, 2007; KHANG *et al.*, 2003). No entanto, o trabalho de Amaral *et al.* (2009) observou, utilizando o ensaio do micronúcleo, que o tratamento com D-AMB induziu um aumento da frequência de micronúcleos em eritrócitos normocromáticos, indicando efeito genotóxico deste tratamento, o que não foi observado nos animais tratados com NANO-D-AMB.

Considerando que os tratamentos foram induzidos pela via intraperitoneal, foi questionada a indução de resposta inflamatória pelas formulações através da contagem diferencial de leucócitos presentes na cavidade peritoneal. Conforme esperado, em todos os grupos avaliados houve predomínio de monócitos em relação a linfócitos e neutrófilos. O tratamento com sobredoses de NANO-D-AMB não induziu diferença na população de células inflamatórias na cavidade peritoneal. No entanto, foi verificada a presença de maior número de neutrófilos e diminuição de linfócitos em animais submetidos à sobredose com D-AMB 5x,

sendo a maior parte deles hipersegmentados. Neste caso, a dose de D-AMB utilizada pode ter sido suficientemente tóxica às células residentes, e possivelmente causou dano celular ou tecidual, levando ao recrutamento dessas células a fim de fazer a remoção do material biológico resultante. Como foi feita uma avaliação relativa da população peritoneal de leucócitos, o aumento dos neutrófilos levou à conseqüente diminuição da quantidade de linfócitos.

A susceptibilidade à PCM está atribuída há uma depressão da resposta imune celular, com o decréscimo dos níveis de citocinas de padrão Th1, como IL-12, IFN γ e IL-2, e elevados níveis de citocinas do padrão Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 (FORTES *et al.*, 2011). O TNF tem o papel de modular e amplificar a resposta imune, promovendo uma reação granulomatosa e estimulando atividade fungicida dos macrófagos (FORTES *et al.*, 2011). Neste estudo, verificamos que os grupos tratados com NANO-D-AMB e Ambisome[®] apresentaram respectivamente níveis elevados de IL-12 e TNF sugerindo um melhoramento da resposta imunológica em favor ao hospedeiro, provavelmente por influência da menor carga fúngica encontrada nesses animais. Outros ensaios devem ser realizados a fim de entender por que os tipos diferentes de nanopartículas (NANO-D-AMB e Ambisome[®]) induziram a uma modulação de citocinas diferentes (respectivamente, IL-12 e TNF). Além disso, os grupos tratados com NANO-D-AMB e Ambisome[®] apresentaram uma recuperação da capacidade linfoproliferativa, que encontra-se reduzida durante a infecção não tratada (grupo PBS), indicando uma melhor resposta imunológica celular para o controle da PCM (RIBEIRO, ALICE M *et al.*, 2009; RIBEIRO, ALICE MELO *et al.*, 2010).

Este estudo, além de comprovar mais uma vez a eficácia do uso da NANO-D-AMB em relação à D-AMB, a apresenta também como alternativa ao tratamento com Ambisome[®]. Embora as formulações lipídicas exibam um índice terapêutico aperfeiçoado, possibilitando a administração de doses maiores e com isso uma eficácia terapêutica melhor, esses produtos são extremamente caros (KLEINBERG, 2006; TORRADO *et al.*, 2008). Além disso, as nanopartículas poliméricas possuem algumas vantagens importantes: (1) ajudam a aumentar a estabilidade das drogas/proteínas; (2) possuem propriedades de liberação controlada úteis (SOPPIMATH *et al.*, 2001); e (3) uma meia vida maior à temperatura ambiente, importante para

seu manuseio (HANS; LOWMAN, 2002; LEMKE *et al.*, 2005; VEN *et al.*, 2012). Devido a seu tamanho, os lipossomas são rapidamente removidos da circulação por células fagocíticas, levando a uma baixa meia-vida da anfotericina na circulação, baixa biodisponibilidade e distribuição pelo corpo alterada (TORRADO *et al.*, 2008). Todas essas questões motivam cada vez mais a utilização de NANO-D-AMB como uma opção ao uso das formulações lipídicas comerciais, como a Ambisome®.

Ainda que os custos para a fabricação de nanopartículas poliméricas sejam maiores que o tratamento com D-AMB, levando em consideração todos os fatores como tempo de hospitalização, monitoramento dos efeitos adversos no paciente e possíveis seqüelas devido a terapia, essa pode muitas vezes ser uma alternativa mais econômica para a saúde pública, diminuindo os custos do estado em longo prazo (BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, 2007; KLEINBERG, 2006). Neste caso, sistemas nanoestruturados de liberação da anfotericina B podem ser mais seguros, potentes e possuírem melhor custo-benefício.

Qualquer que seja o agente antifúngico usado contra uma micose invasiva, a resposta do hospedeiro dependerá da evolução dos mecanismos de defesa naturais dos próprios pacientes. Pesquisas futuras devem focar na estimulação do sistema imunológico e na exploração de opções e limitações de agentes antifúngicos combinados com diferentes modos de ação. (PAUW, 2011). Moléculas associadas com Proteínas de Choque Térmico (*Heat Shock Proteins-HSP*) têm se mostrado uma opção importante, já que estão associadas com diferentes fenômenos da imunidade inata e adaptativa (FORTES *et al.*, 2011; RIBEIRO, ALICE M *et al.*, 2009; RIBEIRO, ALICE MELO *et al.*, 2010; SEGAL *et al.*, 2006).

Por fim, corroborando os resultados anteriormente publicados, NANO-D-AMB apresentou similar capacidade antifúngica sem indução de efeitos adversos em doses terapêuticas, permitiu a diminuição do número de aplicações e ainda possibilitou a diminuição em 25% da dose de anfotericina B utilizada no tratamento da PCM murina. Baseados nos dados aqui apresentados, podemos concluir que a nanoformulação de anfotericina B em polímeros de PLGA tratada neste estudo é uma alternativa interessante às formulações já comerciais, como a anfotericina B deoxicolato e o Ambisome®.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que NANO-D-AMB é uma alternativa interessante ao uso das formulações de anfotericina B deoxicolato e Ambisome®, por apresentar similar capacidade antifúngica e não indução de efeitos adversos em doses terapêuticas, além de permitir a diminuição do número de aplicações e ainda a redução em 25% da dose de anfotericina B utilizada no tratamento da PCM murina.

6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

6.1 RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

SOUZA, A. C. O.; VASCONCELOS, N. M.; JERONIMO, M. S.; AMARAL, A. C.; FELIPE, M. S. S.; BOCCA, A. L. Experimental paracoccidioidomycosis treatment using nanostructured amphotericin B in poly-lactio-co-glycolic acid and ambisome: antifungal comparison in vivo and evaluation of cytotoxicity in vitro. In: XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 2011, Taubaté. Anais, 2011.

SIQUEIRA, I. M.; **SOUZA, A. C. O.**; JERONIMO, M. S.; RIBEIRO, A. M.; INÁCIO, C. A.; CORREA, J. R.; BAO, S. N.; FELIPE, M. S. S.; BOCCA, A. L. Morphological and ultrastructural differences between two different isolates of the fungus *P. brasiliensis*. In: XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 2011, Taubaté/SP. Anais, 2011.

SIQUEIRA, I. M.; NOBREGA, Y. K. M.; SIMON, K.; **SOUZA, A. C. O.**; JERONIMO, M. S.; BOCCA, A. L. Treatment of experimental chromoblastomycosis using DNA vaccine alone or in association with itraconazole and amphotericin B intralesionally. In: XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 2011, Taubaté/SP. Anais, 2011.

JERONIMO, M. S.; NOBREGA, Y. K. M.; **SOUZA, A. C. O.**; SIQUEIRA, I. M.; AMORIN, R.; FIGUEIREDO, F.; BORIN, M. F.; BOCCA, A. L. Recovery of wound healing in immunosuppressed mice by L-arginine topical treatment. In: Immunology 2011, 2011, San Francisco. Anais, 2011.

RIBEIRO, A. M.; **SOUZA, A. C. O.**; AMARAL, A. C.; VASCONCELOS, N. M.; SIQUEIRA, I. M.; JERONIMO, M. S.; FIGUEIREDO, F.; FELIPE, M. S. S.; SILVA, C. L.; BOCCA, A. L. Nanoparticles (liposomal and polymeric) strongly improve the DNA_{hsp65} immunological activity. In: World Immune Regulation Meeting IV, 2010, Davos. Final Programme and Abstracts, 2010.

SOUZA, A. C. O.; VASCONCELOS, N. M.; JERONIMO, M. S.; SIQUEIRA, I. M.; TEDESCO, C. A.; FELIPE, M. S. S.; BOCCA, A. L. Comparação da eficácia terapêutica de

anfotericina B nanoestruturada em PLGA na PCM e avaliação da toxicidade in vitro. In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2010, Brasília/DF. Anais, 2010.

RIBEIRO, A. M.; **SOUZA, A. C. O.**; AMARAL, A. C.; JERONIMO, M. S.; SIQUEIRA, I. M.; PIRANI, F.; FELIPE, M. S. S.; SILVA, C. L.; BOCCA, A. L. DNAhsp65 within PLGA formulation increases the immune response during the treatment of paracoccidioidomycosis in murine model. In: DC2010: Forum on Vaccine Science, 2010, Lugano. Anais, 2010.

JERONIMO, M. S.; **SOUZA, A. C. O.**; BOCCA, A. L.; TAVARES, A. L.; VASCONCELOS, N. M.; FELIPE, M. S. S.; MACHADO, E. R. Occurrence of Trichomonas vaginalis infection among women attending in routine Hospital of University of Brasília in the period of 2007 at 2008. In: XLV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2009, OLINDA-PE. MEDTROP2009, 2009.

RIBEIRO, A. M.; **SOUZA, A. C. O.**; AMARAL, A. C.; VASCONCELOS, N. M.; JERONIMO, M. S.; SIQUEIRA, I. M.; FACCIOLY, L. H.; FIGUEIREDO, F.; FELIPE, M. S. S.; SILVA, C. L.; BOCCA, A. L. DNAhsp65 within liposomal and PLGA formulations increase the immune response during the treatment of paracoccidioidomycosis (pcm) in murine model. In: XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, 2009, Salvador/Bahia. XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, 2009.

MACHADO, E. R.; MEDEIROS, P. B.; SORGI, C. A.; **SOUZA, A. C. O.**; SAAVEDRA, P. H. V.; JERONIMO, M. S.; MAFFEI, C. M. L.; AMARAL, A. C.; FACCIOLY, L. H.; BOCCA, A. L.; FELIPE, M. S. S. Immune defense response in the vaginal mucosa against murine Candida albicans infection. In: XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, 2009, SALVADOR/BAHIA. XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, 2009.

SOUZA, A. C. O.; RIBEIRO, A. M.; FRAGA, C. L. F.; NUNES, J.; AMARAL, A. C.; SIQUEIRA, I. M.; FELIPE, M. S. S.; FIGUEIREDO, F.; BOCCA, A. L. Análise da resposta

imune celular induzida por vacina de DNA na paracoccidiodomicose experimental. In: 5 Congresso de Iniciação Científica do Distrito Federal, 2008, Brasília-DF. 5 Congresso de Iniciação Científica do Distrito Federal, 2008.

SOUZA, A. C. O.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. C.; FRAGA, C. L. F.; NUNES, J.; SIQUEIRA, I. M.; SALLES, B. C.; COELHO-CASTELO, A. A. M.; FIGUEIREDO, F.; SILVA, C. L.; FELIPE, M. S. S.; BOCCA, A. L. Analysis of cellular immune response induced by DNAhsp65 vaccine for experimental paracoccidiodomycosis. In: ImmunoRIB2008, 2008, Ribeirão Preto-SP. Intervention in the Immune System, 2008.

SIQUEIRA, I. M.; FRAGA, C. L. F.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. C.; NUNES, J.; **SOUZA, A. C. O.**; FELIPE, M. S. S.; BOCCA, A. L. Comparative analysis of the immunological response between two different isolates (Pb18 and Pb01) of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In: ImmunoRIB2008, 2008, Ribeirão Preto-SP. Intervention in the Immune System, 2008.

RIBEIRO, A. M.; **SOUZA, A. C. O.**; AMARAL, A. C.; FRAGA, C. L. F.; NUNES, J.; SALLES, B. C.; COELHO-CASTELO, A. A. M.; FIGUEIREDO, F.; SILVA, C. L.; FELIPE, M. S. S.; BOCCA, A. L. Therapeutic activity of a DNA vaccine using the gene hsp65 from *Mycobacterium leprae* for experimental paracoccidiodomycosis. In: International Congress on Paracoccidiodomycosis, 2008, Medellín. International Congress on Paracoccidiodomycosis, 2008.

6.2 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

SAAVEDRA, P. H. V.; AMARAL, A. C.; GOMES, L. M.; **SOUZA, A. C. O.**; FELIPE, M. S. S.; MORAES, P. C.; BOCCA, A. L. Nanoparticles-associated Miconazole against murine experimental Vaginal Candidiasis. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

JERONIMO, M. S.; **SOUZA, A. C. O.**; BOCCA, A. L.; VASCONCELOS, N. M.; TAVARES, A. L.; FELIPE, M. S. S.; MACHADO, E. R. Study of candidiase vaginalis among

women attending in the Hospital of University of Brasília, Brasília, Brazil: 2007-2008. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6.3 ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTAS CIENTÍFICAS

RIBEIRO, ALICE M.; **SOUZA, A. C. O.**; FACCIOLI, LÚCIA H.; COELHO-CASTELO, ARLETE A.M.; FIGUEIREDO, FLORÊNCIO; SILVA, CÉLIO L.; FELIPE, MARIA SUELI S. HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. *Vaccine (Guildford)*, v. 28, p. 1528-1534, 2010.

6.4 ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTAS CIENTÍFICAS

RIBEIRO, A. M.; **SOUZA, A. C. O.**; AMARAL, A. C.; VASCONCELOS, N. M.; JERONIMO, M. S.; CARNEIRO, F. P.; FACCIOLI, LÚCIA H.; FELIPE, MARIA SUELI S.; SILVA, C. L.; BOCCA, A. L.. Nanobiotechnological Approaches to Delivery of DNA Vaccine Against Fungal Infection. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2012.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER-MOORE, J.; PROFFITT, R. T. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 49 Suppl 1, p. 21-30, fev 2002.
- AHMAD, Z.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. **The Indian journal of chest diseases & allied sciences**, v. 48, n. 3, p. 171-6, 2006.
- AI, J.; BIAZAR, E.; JAFARPOUR, M. *et al.* Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 1117-27, jan 2011.
- ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505-15, 2008.
- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D. Antifungal Agents in Neonates. **Pediatric Drugs**, v. 9, n. 5, p. 311-321, 2007.
- AMARAL, A C; BOCCA, A L; RIBEIRO, A M; *et al.* Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 3, p. 526-33, 2009.
- AMARAL, ANDRÉ C; MARQUES, A. F.; MUÑOZ, J. E. *et al.* Poly(lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. **British journal of pharmacology**, v. 159, n. 5, p. 1126-32, mar 2010.
- BALA, I.; HARIHARAN, S.; KUMAR, M. N. V. R. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 21, n. 5, p. 387-422, jan 2004.
- BARRATT, GILLIAN; BRETAGNE, S. Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. **International journal of nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 301-13, jan 2007.
- BERLINER, M. D.; RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Medical Mycology**, v. 5, n. 1, p. 26-29, jan 1967.
- BLONDIN, P.; DUFOUR, M.; SIRARD, M. A. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 3, p. 631-7, mar 1996.
- BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, v. 9, n. 9, p. 705-14; quiz 715, set 2011.
- BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 80-87, fev 2002.

- BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 4, p. 512-31, out 1996.
- BURGES, J. L.; BIRCHALL, R. Nephrotoxicity of amphotericin B, with emphasis on changes in tubular function. **The American journal of medicine**, v. 53, n. 1, p. 77-84, jul 1972.
- CALICH, V. L.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British journal of experimental pathology**, v. 66, n. 5, p. 585-94, out 1985.
- CAMARGO, Z. P. DE; FRANCO, M. F. DE. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista iberoamericana de micología**, v. 17, n. 2, p. 41-8, jun 2000.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-9, jun 2006.
- CHAKRABARTI, A. Microbiology of systemic fungal infections. **Journal of postgraduate medicine**, v. 51 Suppl 1, p. S16-20, jan 2005.
- CHITHRANI, B. D.; GHAZANI, A. A.; CHAN, W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano letters**, v. 6, n. 4, p. 662-8, abr 2006.
- COCK, A. M.; CANO, L E; VÉLEZ, D. *et al.* Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable paracoccidioides brasiliensis propagules. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 59-66, 2000.
- COESTER, C.; KREUTER, J; BRIESEN, H. VON; LANGER, K. Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA). **International journal of pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 147-9, 10 mar 2000.
- COSTA LIMA, S. A.; RESENDE, M.; SILVESTRE, R. *et al.* Characterization and evaluation of BNIPDaoc-loaded PLGA nanoparticles for visceral leishmaniasis: in vitro and in vivo studies. **Nanomedicine (London, England)**, 20 jul 2012.
- CUNHA-AZEVEDO, E. P.; SILVA, J. R.; MARTINS, O. P. *et al.* In vitro antifungal activity and toxicity of itraconazole in DMSA-PLGA nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 2308-14, mar 2011.
- DAMGÉ, C.; MAINCENT, P.; UBRICH, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 117, n. 2, p. 163-70, 12 fev 2007.
- DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 6, p. 505-21, 10 jul 2007.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271-7, 22 maio 1986.

DERAY, G.; MERCADAL, L.; BAGNIS, C. [Nephrotoxicity of amphotericin B]. **Néphrologie**, v. 23, n. 3, p. 119-22, jan 2002.

DOANE, T. L.; BURDA, C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. **Chemical Society reviews**, n. 7, 27 jan 2012.

DU, L.; CHENG, J.; CHI, Q. *et al.* Biodegradable PLGA microspheres as a sustained release system for a new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 54, n. 9, p. 1259-65, set 2006.

DUNCAN, RUTH. Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 492-501, ago 2011.

DUNCAN, RUTH; GASPAR, R. Nanomedicine(s) under the microscope. **Molecular pharmaceuticals**, v. 8, n. 6, p. 2101-41, 5 dez 2011.

DUNCAN, R.; GAC-BRETON, S.; KEANE, R. *et al.* Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 74, n. 1-3, p. 135-46, 6 jul 2001.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 49 Suppl 1, p. 31-6, fev 2002.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 49 Suppl 1, p. 7-10, fev 2002.

ESPUELAS, M. S.; LEGRAND, P.; CAMPANERO, M. A. *et al.* Polymeric carriers for amphotericin B: in vitro activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 419-27, set 2003.

FALAMARZIAN, A.; LAVASANIFAR, A. Optimization of the hydrophobic domain in poly(ethylene oxide)-poly(varepsilon-caprolactone) based nano-carriers for the solubilization and delivery of Amphotericin B. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 313-20, 1 nov 2010.

FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatric respiratory reviews**, v. 10, n. 4, p. 161-5, dez 2009.

FLÜCKIGER, U.; MARCHETTI, O.; BILLE, J. *et al.* Treatment options of invasive fungal infections in adults. **Swiss medical weekly**, v. 136, n. 29-30, p. 447-63, 22 jul 2006.

FORTES, M. R. P.; MIOT, H. A.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E. A.; MARQUES, S. A. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516-24, jul 2011.

FUKUI, H. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS®). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1-2, p. 51-60, set 2003.

GABLER, F.; FRAUENSCHUH, S.; RINGE, J. *et al.* Emulsion-based synthesis of PLGA-microspheres for the in vitro expansion of porcine chondrocytes. **Biomolecular engineering**, v. 24, n. 5, p. 515-20, nov 2007.

- GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Reviews of infectious diseases**, v. 12, n. 2, p. 308-29, [S.d.].
- GOLENSER, J.; DOMB, A. New formulations and derivatives of amphotericin B for treatment of leishmaniasis. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 6, n. 2, p. 153-62, fev 2006.
- GOMES, A. J.; BARBOUGLI, P. A.; ESPREAFICO, E. M.; TFOUNI, E. trans-[Ru(NO)(NH₃)₄(py)](BF₄)₃.H₂O encapsulated in PLGA microparticles for delivery of nitric oxide to B16-F10 cells: Cytotoxicity and phototoxicity. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 757-66, abr 2008.
- GONZÁLEZ, A.; LENZI, HENRIQUE LEONEL; MOTTA, E. M. *et al.* Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **International journal of experimental pathology**, v. 89, n. 2, p. 106-16, abr 2008.
- GONZÁLEZ, A.; RESTREPO, ANGELA; CANO, LUZ ELENA. Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 313-330, 24 abr 2008.
- GONZÁLEZ, G. M.; TIJERINA, R.; NAJVAR, L. K. *et al.* Efficacies of amphotericin B (AMB) lipid complex, AMB colloidal dispersion, liposomal AMB, and conventional AMB in treatment of murine coccidioidomycosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2140-3, jun 2004.
- GRATTON, S. E. A; ROPP, P. A; POHLHAUS, P. D. *et al.* The effect of particle design on cellular internalization pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11613-8, 19 ago 2008.
- GULLO, A. Invasive fungal infections: the challenge continues. **Drugs**, v. 69 Suppl 1, p. 65-73, jan 2009.
- GUO, L. S. Amphotericin B colloidal dispersion: an improved antifungal therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 149-63, 25 maio 2001.
- GUO, L. S. S.; WORKING, P. K. Complexes of Amphotericin B and Cholesteryl Sulfate. **Journal of Liposome Research**, v. 3, n. 3, p. 473-490, jan 1993.
- HANS, M. .; LOWMAN, A. . Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, ago 2002.
- HIEMENZ, J. W.; WALSH, T. J. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 22 Suppl 2, p. S133-44, maio 1996.
- HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S. K.; PERIAGO, M. R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 9, p. e300, jan 2008.
- ITALIA, J L; KUMAR, M. N. V. R.; CARTER, K C. Evaluating the potential of polyester nanoparticles for per oral delivery of amphotericin B in treating visceral leishmaniasis. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 8, n. 4, p. 695-702, ago 2012.

- ITALIA, J L.; YAHYA, M. M.; SINGH, D.; RAVI KUMAR, M. N. V. Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous Fungizone. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 6, p. 1324-31, jun 2009.
- ITALIA, JAGDISHBHAI L.; SHARP, A.; CARTER, KATHARINE C; WARN, P.; KUMAR, M. N. V. R. Peroral Amphotericin B Polymer Nanoparticles Lead to Comparable or Superior In Vivo Antifungal Activity to That of Intravenous AmbisomeH or Fungizone TM. **October**, v. 6, n. 10, 2011.
- JAIN, K. K. Advances in the field of nanooncology. **BMC medicine**, v. 8, n. 1, p. 83, jan 2010.
- JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475-90, dez 2000.
- JAIN, R. K.; STYLIANOPOULOS, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 7, n. 11, p. 653-64, nov 2010.
- JAIN, S.; VALVI, P. U.; SWARNAKAR, N. K.; THANKI, K. Gelatin Coated Hybrid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery of Amphotericin B. **Molecular pharmaceuticals**, 30 jul 2012.
- JANOFF, A. S.; PERKINS, W. R.; SALETAN, S. L.; SWENSON, C. E. Amphotericin B Lipid Complex (Ablc™): A Molecular Rationale for the Attenuation of Amphotericin B Related Toxicities. **Journal of Liposome Research**, v. 3, n. 3, p. 451-471, jan 1993.
- KERR, I. B.; ARARIPE, J. R.; OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 5, p. 336-50, 1988.
- KHANG, G.; RHEE, J. M.; JEONG, J. K. *et al.* Local drug delivery system using biodegradable polymers. **Macromolecular Research**, v. 11, n. 4, p. 207-223, ago 2003.
- KIM, B. Y. S.; RUTKA, J. T.; CHAN, W. C. W. Nanomedicine. **The New England journal of medicine**, v. 363, n. 25, p. 2434-43, 16 dez 2010.
- KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? **International journal of antimicrobial agents**, v. 27 Suppl 1, p. 12-6, jun 2006.
- KOHANE, D. S.; TSE, J. Y.; YEO, Y. *et al.* Biodegradable polymeric microspheres and nanospheres for drug delivery in the peritoneum. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 77, n. 2, p. 351-61, maio 2006.
- KREUTER, JÖRG. Nanoparticles. In: KREUTER, JÖRG (Ed.). **Colloidal Drug Delivery Systems**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 219-342.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, jan 2010.
- KUNZMANN, A.; ANDERSSON, B.; THURNHERR, T. *et al.* Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1810, n. 3, p. 361-73, mar 2011.

- LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 223-7, 31 dez 2009.
- LEE, D.-E.; KOO, H.; SUN, I.-C. *et al.* Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. **Chemical Society reviews**, v. 41, n. 7, p. 2656-72, 7 abr 2012.
- LEGRAND, P.; BOLARD, J. Comparative internalization and recycling of different amphotericin B formulations by a macrophage-like cell line. p. 519-533, 1996.
- LEGRAND, P.; CHÉRON, M.; LEROY, L.; BOLARD, J. Release of amphotericin B from delivery systems and its action against fungal and mammalian cells. **Journal of drug targeting**, v. 4, n. 5, p. 311-9, jan 1997.
- LEMKE, A; KIDERLEN, A F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151-62, ago 2005.
- LINARES, L. I.; FRIEDMAN, L. Experimental paracoccidioidomycosis in mice. **Infection and immunity**, v. 5, n. 5, p. 681-7, maio 1972.
- MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 65, n. 1-2, p. 271-84, 1 mar 2000.
- MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. **Journal of nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 55, jan 2011.
- MANANDHAR, K. D.; YADAV, T. P.; PRAJAPATI, V. K. *et al.* Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 2, p. 376-80, ago 2008.
- MARQUES, A. F.; SILVA, M. B. DA; JULIANO, M. A P. *et al.* Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 10, n. 12-13, p. 1251-8, out 2008.
- MARTINEZ, R. Carta ao Editor / Letter to Editor Paracoccidioidomycosis : the dimension of the problem of a neglected disease Paracoccidioidomicose : a dimensão do problema de uma doença negligenciada. **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 43, n. 4, p. 2010, 2010.
- MEDINA, C.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, A; CORRIGAN, O. I.; RADOMSKI, M. W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British journal of pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 552-8, mar 2007.
- MILNER, A. E.; VAUGHAN, A. T.; CLARK, I. P. Measurement of DNA damage in mammalian cells using flow cytometry. **Radiation research**, v. 110, n. 1, p. 108-17, abr 1987.
- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 2, p. 283-318, jun 2001.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez 1983.
- MU, L.; FENG, S. S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 86, n. 1, p. 33-48, 9 jan 2003.
- NAHAR, M.; JAIN, NARENDRA K. Preparation, characterization and evaluation of targeting potential of amphotericin B-loaded engineered PLGA nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 12, p. 2588-98, dez 2009.
- NAHAR, M.; MISHRA, D.; DUBEY, V.; JAIN, NARENDRA KUMAR. Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 4, n. 3, p. 252-61, set 2008.
- NICOLETE, R.; SANTOS, D. F. DOS; FACCIOLI, LÚCIA H. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1557-63, out 2011.
- NISHI, I.; SUNADA, A.; TOYOKAWA, M.; ASARI, S.; IWATANI, Y. In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 15, n. 1, p. 1-5, mar 2009.
- NUNE, S. K.; GUNDA, P.; THALLAPALLY, P. K. *et al.* Nanoparticles for biomedical imaging. **Expert opinion on drug delivery**, v. 6, n. 11, p. 1175-94, nov 2009.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L.; MARR, K. A.; REX, JOHN H.; COHEN, S. H. Amphotericin B: time for a new “gold standard”. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 37, n. 3, p. 415-25, 1 ago 2003.
- PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 329-347, fev 2003.
- PAULO, C. S. O.; VIDAL, M.; FERREIRA, L. S. Antifungal Nanoparticles and Surfaces. p. 2810-2817, 2010.
- PAUW, B. D. Antifungal Therapy. **TPS**, v. 43, n. 6, p. 2461-2462, 2011.
- RAMA IÑIGUEZ, S.; DEA-AYUELA, M. A.; SANCHEZ-BRUNETE, J. A. *et al.* Real-time reverse transcription-PCR quantification of cytokine mRNA expression in golden Syrian hamster infected with *Leishmania infantum* and treated with a new amphotericin B formulation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1195-201, abr 2006.
- RESTREPO, S.; TOBON, A.; TRUJILLO, J.; RESTREPO, A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 30, n. 3, p. 173-84, jan 1992.
- RIBEIRO, A.; SOUZA, A.; AMARAL, A. *et al.* Nanobiotechnological approaches to delivery of DNA vaccine against fungal infection. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 2012.

RIBEIRO, ALICE M; BOCCA, ANAMELIA L; AMARAL, ANDRÉ C; *et al.* DNAhsp65 vaccination induces protection in mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Vaccine**, v. 27, n. 4, p. 606-13, jan 2009.

RIBEIRO, ALICE MELO; BOCCA, ANAMELIA LORENZETTI; AMARAL, ANDRÉ CORREA; *et al.* HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. **Vaccine**, v. 28, n. 6, p. 1528-34, fev 2010.

ROCO, M C; WILLIAMS, R. S.; ALIVISATOS, P. (EDS). Biological, medical and health applications. **Nanotechnology Research Directions**, v. Chapter 8, n. September, 1999.

ROCO, MIHAIL C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 337-346, jun 2003.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275-88, abr 2011.

SCAVONE, R.; BURGER, EVA. Paracoccidioidomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity anergy in susceptible inbred mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. **Medical microbiology and immunology**, v. 193, n. 1, p. 53-9, fev 2004.

SEGAL, B. H.; WANG, X.-Y.; DENNIS, C. G. *et al.* Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. **Drug discovery today**, v. 11, n. 11-12, p. 534-40, jun 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. D. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, jun 2006.

SHIM, Y.-H.; KIM, Y.-C.; LEE, H.-J. *et al.* Amphotericin B aggregation inhibition with novel nanoparticles prepared with poly(epsilon-caprolactone)/poly(n,n-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) diblock copolymer. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 28-36, jan 2011.

SHIVE, M.; ANDERSON, J. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced drug delivery reviews**, v. 28, n. 1, p. 5-24, 13 out 1997.

SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E; RUSSO, M.; VAZ, C. A.; CALICH, V. L. Advances in experimental paracoccidioidomycosis using an isogenic murine model. **Archives of medical research**, v. 24, n. 3, p. 239-45, jan 1993.

SINGER-VERMES, L. M.; CIAVAGLIA, M. C.; KASHINO, S. S.; BURGER, E; CALICH, V. L. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 30, n. 3, p. 261-4, jan 1992.

SINGH, P.; GUPTA, A.; JAISWAL, A. *et al.* Design and development of Amphotericin B bearing polycaprolactone microparticles for macrophage targeting. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 50-1, fev 2011.

SINGODIA, D.; KHARE, P.; DUBE, A; *et al.* Development and performance evaluation of alginate-capped amphotericin B lipid nanoconstructs against visceral leishmaniasis. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 123-4, fev 2011.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 29 jan 2001.

SPRINTZ, M. Editorial: Nanotechnology for advanced therapy and diagnosis. **Biomedical microdevices**, v. 6, n. 2, p. 101-3, jun 2004.

SÁNCHEZ-BRUNETE, J. A.; DEA, M. A.; RAMA, S. *et al.* Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3246-52, set 2004.

SÁNCHEZ-BRUNETE, J. A.; DEA, M. A.; RAMA, S. *et al.* Influence of the vehicle on the properties and efficacy of microparticles containing amphotericin B. **Journal of drug targeting**, v. 13, n. 4, p. 225-33, maio 2005.

THORNTON, S. J.; WASAN, K. M. The reformulation of amphotericin B for oral administration to treat systemic fungal infections and visceral leishmaniasis. **Expert opinion on drug delivery**, v. 6, n. 3, p. 271-84, mar 2009.

TIYABOONCHAI, W.; LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 142-9, 1 fev 2007.

TORRADO, J. J.; ESPADA, R.; BALLESTEROS, M. P. Amphotericin B Formulations and Drug Targeting. **Structure**, v. 97, n. 7, p. 2405-2425, 2008.

TSAI, M.; LU, Z.; WANG, J. *et al.* Effects of carrier on disposition and antitumor activity of intraperitoneal Paclitaxel. **Pharmaceutical research**, v. 24, n. 9, p. 1691-701, set 2007.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British journal of cancer**, v. 56, n. 3, p. 279-85, set 1987.

TÜREL, O. Newer antifungal agents. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 9, n. 3, p. 325-38, mar 2011.

VANDEN BOSSCHE, H.; DROMER, F.; IMPROVISI, I. *et al.* Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 36 Suppl 1, p. 119-28, jan 1998.


VEN, H. V. D.; PAULUSSEN, C.; FEIJENS, P. B. *et al.* PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B : Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 795-803, 2012.

VENIER-JULIENNE, M. C.; VOULDOUKIS, I.; MONJOUR, L.; BENOIT, J. P. In vitro study of the anti-leishmanial activity of biodegradable nanoparticles. **Journal of drug targeting**, v. 3, n. 1, p. 23-9, jan 1995.

- VERMA, R. K.; PANDYA, S.; MISRA, A. Loading and release of amphotericin-B from biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 118-20, fev 2011.
- VYAS, S. P.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. **International journal of nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 417-32, jan 2006.
- WEISSLEDER, R. Molecular imaging in cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5777, p. 1168-71, 26 maio 2006.
- WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 3, p. 309-17, 1 ago 2004.
- XU, N.; GU, J.; ZHU, Y. *et al.* Efficacy of intravenous amphotericin B-polybutylcyanoacrylate nanoparticles against cryptococcal meningitis in mice. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 905-13, jan 2011.
- ZAMBAUX, M. F.; BONNEAUX, F.; GREF, R.; DELLACHERIE, E.; VIGNERON, C. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 60, n. 2-3, p. 179-88, 5 ago 1999.
- ZHANG, Z.; HUEY LEE, S.; FENG, S.-S. Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery. **Biomaterials**, v. 28, n. 10, p. 1889-99, abr 2007.

8 ANEXOS

8.1 DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA/FM/UNB)

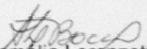


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 27 de março de 2007.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA DROGA ANFOTERICINAB E DO ITRACONAZOL NANOENCAPSULADAS COM E/OU SEM FLUIDO MAGNÉTICO NO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM MODELO EXPERIMENTAL MURINA**”, sob responsabilidade da Profa. Maria Sueli Soares Felipe, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA

8.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

8.2.1 Meio YPD (Yeast Peptone Dextrose)

- 10 g de extrato de levedura
- 20 g de bacto-peptona
- 20 g de glicose
- 40 µg/mL de gentamicina
- 1 L de água destilada

Os reagentes foram diluídos na água destilada (com exceção da gentamicina) e ajustou-se o pH para 7,2 com HCl e NaOH. A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C. Após o meio resfriar, acrescentou-se a gentamicina. O meio pronto foi armazenado a 4°C até sua utilização.

8.2.2 PBS (Phosphate Buffered Saline)

- 136,8 mM de NaCl
- 2,7 mM de KCl
- 0,9 mM de fosfato de potássio monobásico
- 6,4 mM de fosfato de sódio dibásico

Os reagentes foram diluídos em água destilada e ajustou-se o pH para 7,2 com HCl e NaOH. Para obter o PBS estéril, a solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C. Após o resfriar, a solução foi armazenada a 4°C até sua utilização.

8.2.3 Corante/fixador hematológico Giemsa-Wright-Metanol

- 3 g de corante Wright
- 0,33g de corante Giemsa
- 30 mL de glicerina
- 1 L de metanol PA

Dissolveu-se os corantes em metanol e em seguida adicionou-se a glicerina, agitando bem por 10 minutos sem parar. A solução foi filtrada em papel de filtro e armazenada a temperatura ambiente.

8.2.4 Formol tamponado para fixação de tecidos

- 100 mL de formaldeído a 35-40%
- 900 mL de água destilada
- 4 g de fosfato monobásico de sódio
- 6,5 g de fosfato dibásico (anidro) de sódio

Misturou-se os tampões fosfato em 500 mL de água destilada morna para completa dissolução. Após esta solução resfriar, adicionou-se o restante de água destilada (400 mL) e o formaldeído. A solução foi armazenada a temperatura ambiente.

8.2.5 Meio BHI (Brain Heart Infusion)

8.2.5.1 Meio BHI líquido para cultivo do isolado Pb192 de *P. brasiliensis*

- 37 g de Caldo BHI
- 0,8% de glicose
- 40 µg/mL de gentamicina
- 1 L de água destilada

Os reagentes foram diluídos na água destilada (com exceção da gentamicina) e ajustou-se o pH para 7,2 com HCl e NaOH. A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C. Após o meio resfriar, acrescentou-se a gentamicina. O meio pronto foi armazenado a 4°C até sua utilização.

8.2.5.2 Meio BHI sólido para recuperação de leveduras de *P. brasiliensis* do pulmão

- 52 g de agar BHI
- 0,8% de glicose
- 5% de sobrenadante de cultura filtrado do isolado de *P. brasiliensis* Pb 192 (vide abaixo)
- 4% de Soro de Cavalo
- 40 µg/mL de gentamicina

- 1 L de água destilada

Os reagentes foram diluídos na água destilada (com exceção da gentamicina, do sobrenadante de cultura de Pb192 e do soro de cavalo) e ajustou-se o pH para 7,2 com HCl e NaOH. A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C. Após o meio de cultura resfriar acrescentou-se a gentamicina. Distribuiu-se 20 mL do meio de cultura a placas de petri descartáveis de 90mmx15mm e após solidificar, o meio pronto foi armazenado a 4°C até sua utilização.

8.2.5.3 Meio BHI sólido para determinação de CMI de NANO-D-AMB

- 52 g de agar BHI
- 4% de glicose
- 4% de SBF
- 40 µg/mL de gentamicina
- 1 L de água destilada

Os reagentes foram diluídos na água destilada (com exceção da gentamicina) e ajustou-se o pH para 7,2 com HCl e NaOH. A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C. Após o meio de cultura resfriar a uma temperatura de aproximadamente 60°C, os demais reagentes foram acrescentados à solução. Distribuiu-se 20 mL do meio de cultura a placas de petri descartáveis de 90mmx15mm e após solidificar, o meio pronto foi armazenado a 4°C até sua utilização.

8.2.6 Fator de crescimento do isolado de *P.brasiliensis* Pb192 (FC Pb192)

Leveduras do isolado Pb192 foram inoculadas em 500 mL de meio BHI e crescidas por 15 dias a 37°C sob agitação de 150 rpm. Após esse período a cultura foi centrifugada a 4000g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado, armazenado a -20°C e usado como fator de crescimento para recuperação de leveduras no pulmão (SINGER-VERMES *et al.*, 1992).

8.2.7 Tampão de lise com Iodeto de Propídeo

- 0,1% de citrato de sódio
- 0,1% Triton X-100

- 20 µg/ml de iodeto de propídeo em PBS

Os reagentes foram diluídos em PBS e ajustou-se o pH para 7,2 com HCl e NaOH. A solução foi mantida a 4°C protegida da luz até o momento do uso.

8.2.8 Meio RPMI 1640

8.2.8.1 RPMI simples

- RPMI 1640 (pó pronto, quantidade para 1 L de meio)
- 10mM de HEPES
- 2g de bicarbonato de sódio
- 40 µg/mL de gentamicina
- 1 L de água Mili-Q

Todos reagentes foram diluídos na água Mili-Q em recipiente higienizado e ajustou-se o pH para 7,2 com HCl e NaOH. A solução foi esterilizada por filtração usando membrana de 0,22µm e armazenada em recipiente estéril a 4°C até momento do uso.

8.2.8.2 RPMI suplementado para cultura de linfócitos

- 100 mL de RPMI simples
- 10µg/mL de ciprofloxacina
- 2mM de L-glutamina
- 5% de SBF
- 50µM de 2-mercaptoetanol
- 1mM de piruvato de sódio
- 1% de aminoácidos não essenciais

Todos reagentes foram diluídos em RPMI simples de forma asséptica em recipiente estéril e o meio pronto foi armazenado a 4°C até momento do uso.

8.2.8.3 RPMI suplementado para cultura de macrófagos

- 100 mL de RPMI simples

- 2mM de L-glutamina
- 10% de SBF

Todos reagentes foram diluídos em RPMI simples de forma asséptica em recipiente estéril e o meio pronto foi armazenado a 4°C até momento do uso.