

Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ANFOTERICINA
B CONJUGADA COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
ESTABILIZADAS COM BICAMADA DE
ÁCIDO LAURICO NO TRATAMENTO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Camila de Arruda Saldanha

Brasília/DF
Dezembro de 2012

Camila de Arruda Saldanha

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ANFOTERICINA
B CONJUGADA COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
ESTABILIZADAS COM BICAMADA DE
ÁCIDO LAURICO NO TRATAMENTO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

**Tese apresentada ao programa de
Pós-graduação em Biologia Animal,
do Instituto de Biologia da
Universidade de Brasília, como
parte dos requisitos necessários
para a obtenção do Título de
Doutor em Biologia Animal.**

Orientador: Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
Co-Orientadoras: Dra. Maria de Fátima Menezes de Almeida Santos
Dra. Mônica Pereira Garcia

Brasília
2012

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu filho,
amigo e companheiro Gabriel, meu
maior tesouro, a mais pura forma de
amor

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade diária de vida e graças recebidas diariamente;

À minha família pela confiança e apoio nos momentos necessários. Por acreditarem em meu potencial e me incentivarem nesta luta;

Aos meus orientadores Ricardo Bentes, Maria de Fátima e Mônica através da qual inúmeras portas se abriram em minha vida acadêmica. Obrigada pela oportunidade, paciência, incentivo e orientação.

Agradeço a professora Emília Lima do Instituto de química e a sua aluna Luciana Guilherme, por gentilmente ter cedido a amostra Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico;

Aos colegas de laboratório Ana Camila, André Amaral e Marcio pela paciência, dedicação e ajuda em toda a parte experimental deste projeto.

À professora Ana Amélia pelo apoio e transmissão de conhecimentos;

Aos meus colegas queridos Vanessa Carvalho, Luciana Marzulo, Jaqueline, Patricia, Larissa Mello, Maite, Diego Iocca obrigada pelos ensinamentos, carinho, amizade, gargalhadas (que foram muitas), companhia e respeito que vocês sempre tiveram por mim;

Ao técnico Djalma por toda ajuda e dicas no preparo da histologia;

E todos aqueles que de alguma forma convivem comigo e me auxiliam.

RESUMO

A paracoccidiodomicose, Pbmicose, é uma micose sistêmica autóctone da América central e do sul, de caráter endêmico entre as populações de zona rural. Dentre os fármacos mais utilizados no tratamento da Pbmicose destacam-se o Itraconazol e a Anfotericina B. Este último possui amplo espectro antifúngico e potente atividade fungicida. Apesar disso, induz em humanos diversos efeitos adversos, principalmente a nefrotoxicidade. Nesse contexto, novas estratégias tais como a ligação da Anfotericina B a estruturas biocompatíveis têm sido desenvolvidas para diminuir a sua concentração no plasma sanguíneo e aumentar nos órgãos alvos da terapia e, assim, reduzir os efeitos colaterais induzidos por esse fármaco. Dentre essas estruturas destacam-se os materiais nanoestruturados como as nanopartículas magnéticas. Entretanto, para serem utilizadas na biomedicina essas nanopartículas devem ser biodegradáveis, hemocompatíveis e não tóxicas ao organismo. Para tal, é importante que elas sejam recobertas por substâncias estabilizantes. Nesse sentido, a fim de desenvolver um sistema controlado de entrega de drogas e de reduzir os efeitos colaterais da Anfotericina B, conjugou-se esse fármaco a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-BlaAmB, no tratamento da Pbmicose experimental. Inicialmente, fez-se necessário avaliar se a Anfotericina B nesse complexo mantinha atividade antifúngica e se era tóxica para células de mamíferos. Assim, o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado virulento 18 (Pb18) e células mesangiais humanas e macrófagos peritoneais murinos foram tratadas, *in vitro*, com FM-BlaAmB. Os resultados demonstram que a Anfotericina B no complexo FM-BlaAmB mantém a atividade antifúngica similar a Ambisome® e não é tóxica para células de mamíferos. Diante desses dados promissores decidiu-se realizar ensaios *in vivo* de modo a verificar se a Anfotericina B no complexo FM-BlaAmB era eficaz na Pbmicose experimental, sem, entretanto, ser tóxica para o hospedeiro. Para tal, camundongos BALB/c foram infectados com o fungo

Pb18 e tratados com o complexo durante as formas aguda e crônica da doença, por 30 e 60 dias. A determinação da carga fúngica no pulmão, a histopatologia dos órgãos pulmão, baço, fígado e rim, além da quantificação de citocinas e do DNA fragmentado em células de medula óssea foram realizadas 24 horas após o último tratamento. Os resultados mostram que a Anfotericina B no complexo é eficaz contra a paracoccidiodomicose experimental na infecção aguda, mas não na infecção crônica e não induz alterações bioquímicas e clínicas nem histopatológicas no fígado, nos rins nem no baço de camundongos BALB/c. Ela também não induz efeitos genotóxicos em células da medula óssea desses animais. Assim sendo, é plausível acreditar que a Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, por apresentar similar capacidade antifúngica e não induzir efeitos adversos em doses terapêuticas na infecção aguda, além de permitir a diminuição do número de aplicações no tratamento da Pbmicosse murina, possa ser uma alternativa ao uso das formulações de Anfotericina B deoxicolato e Ambisome®. Porém estudos posteriores são necessários para melhorar a eficácia no tratamento da infecção crônica.

Palavras-chave: *nanopartículas magnéticas, Anfotericina B, paracoccidiodomicose, Pbmicosse*

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis, PCM, systemic mycosis is a native of Central and South America, the endemic among rural populations. Among the most commonly used drugs in the treatment of PCM stand out Itraconazole and Amphotericin B. The latter has broad spectrum antifungal and potent fungicidal activity. Nevertheless, induces several side effects in humans, particularly nephrotoxicity. In this context, new strategies such as the binding of amphotericin B to biocompatible structures have been developed to reduce its concentration in blood plasma and increase in target organs of therapy and thereby reduce the side effects induced by this drug. Among these structures stand out nanostructured materials as magnetic nanoparticles. However, for use in biomedicine these nanoparticles should be biodegradable and non-toxic hemocompatible to the body. For this it is important that they are coated by stabilizing substances. Accordingly, in order to develop a system controlled delivery of drugs and reduce side effects of Amphotericin B, this drug is conjugated to magnetic nanoparticles stabilized bilayer lauric acid. This study aimed to evaluate the efficacy of amphotericin B when coupled to magnetic nanoparticles stabilized bilayer lauric acid, FM-BlaAmB in experimental treatment of PCM. Initially, it was necessary to assess whether this Complex Amphotericin B had antifungal activity and was toxic to mammalian cells. Thus, *Paracoccidioides brasiliensis*, virulent isolate 18 (Pb18), and human mesangial cells and murine peritoneal macrophages were treated in vitro with FM-BlaAmB. The results show that the amphotericin B in the complex FM-BlaAmB maintains antifungal activity similar to Ambisome® and is not toxic to mammalian cells. Given these encouraging data was decided to conduct in vivo tests to verify that the Amphotericin B in the complex FM-BlaAmB was effective in experimental Pbmicosis, without, however, be toxic to the host fungus. To this end, BALB / c mice were infected with the fungus Pb18 and treated with the compound during the acute and chronic forms of the disease for 30 and 60 days. The determination of the fungal load in the lung histopathology of organs such as lung, spleen, liver and kidney in addition to the quantification of cytokines and the fragmented DNA into bone marrow cells were performed 24 hours after the

last treatment. The results show that the amphotericin B in the complex is effective against paracoccidioidomycosis infection in experimental acute, but not chronic infection and does not induce clinical or biochemical and histopathological liver, kidney or spleen of BALB / c mice. It also does not induce genotoxic effects in bone marrow cells of these animals. Therefore, it is reasonable to believe that the Amphotericin B when coupled to magnetic nanoparticles stabilized bilayer lauric acid, by having similar antifungal capacity and do not induce adverse effects at therapeutic doses in acute infection and also allows reducing the number of applications in the treatment of PCM murine, can be an alternative to the use of the formulations of amphotericin B deoxycholate and Ambisome ®. But further studies are needed to improve effectiveness in the treatment of chronic infection.

Keywords: magnetic nanoparticles, Amphotericin B, paracoccidioidomycosis

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Amostra.....	21
3.2. Estudos <i>in vitro</i>	22
3.2.1. Linhagens celulares.....	22
3.2.2. Manutenção das linhagens celulares	23
3.2.2.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	23
3.2.2.2. Células de mamíferos	23
3.2.3. Concentração mínima da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico necessária para inibir o crescimento do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	24
3.2.4. Análise da toxicidade da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico em células de mamíferos.....	25
3.3. Ensaios <i>in vivo</i>	26
3.3.1. Modelo Animal	26
3.3.2. Estabelecimento da Paracoccidioidomicose.....	27
3.3.3. Grupos Experimentais	27
3.3.4. Avaliação Clínica	28
3.3.5. Obtenção dos órgãos e tecidos	28

3.3.5.1. <i>Determinação da carga fúngica nos pulmões dos camundongos</i>	29
3.3.5.2. <i>Análise histopatológica dos pulmões dos animais com paracoccidiodomicose</i>	29
3.3.5.3. <i>Dosagens de citocinas pela técnica de ELISA</i>	27
3.3.6. Avaliação da toxicidade da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, utilizando-se parâmetros bioquímicos	30
3.3.7. Avaliação da genotoxicidade da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico em células de medula óssea	31
3.3.8. Análise Estatística	32
4.RESULTADOS	33
4.1. Ensaios <i>in vitro</i>	34
4.1.1. <i>Concentração mínima da Anfotericina B conjugada ao fluido magnético de bicamada de ácido láurico necessária para inibir o crescimento do fungo Paracoccidioides brasiliensis</i>	34
4.1.2. <i>Toxicidade da Anfotericina B conjugada ao fluido magnético de bicamada de ácido láurico sobre células mesangiais e macrófagos peritoneais</i>	35
4.2. Ensaios <i>in vivo</i>	39
4.2.1. <i>Estabelecimento da Paracoccidiodomicose no modelo experimental murino por via intratraqueal</i>	39
4.2.2. <i>Avaliação clínica</i>	40
4.2.3. <i>Determinação da carga fúngica nos pulmões de camundongos com a forma aguda e crônica da paracoccidiodomicose</i>	41
4.2.4. <i>Análise histopatológica dos pulmões dos animais com paracoccidiodomicose</i>	43
4.2.5. <i>Análise da toxicidade</i>	47
4.2.5.1. <i>Análise histopatológica do baço, do fígado e dos rins dos animais com paracoccidiodomicose</i>	47
4.2.5.2. <i>Avaliação da toxicidade da Anfotericina B conjugada ao fluido magnético bicamada de ácido láurico</i>	50
4.2.6. <i>Dosagens das citocinas</i>	52

4.2.7. <i>Genotoxicidade da Anfotericina B conjugada com nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico sobre células</i>	56
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da Paracoccidiodomicose	02
Figura 2. Estrutura química do fármaco Anfotericina B	08
Figura 3. Unidades formadoras de colônia, UFC, do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> isolado Pb18 cultivados por três dias na presença de Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-BlaAmB, ou na presença de Anfotericina B não conjugada, AmB, em diversas concentrações de Anfotericina B.....	35
Figura 4. Frequência de células mesangiais humanas e macrófagos peritoneais murinos viáveis após exposição a Anfotericina B conjugada ao fluido magnético de bicamada de ácido láurico, FM-BlaAmB, a Anfotericina B não conjugada, AmB e ao fluido magnético de bicamada de ácido láurico, FM-Bla.....	38
Figura 5. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de pulmão de camundongo BALB/c, corados com hematoxilina e eosina, indicando a presença de granulomas com células de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	39
Figura 6. Massas corpóreas dos camundongos (n=10) antes e após trinta e sessenta dias de tratamento da paracoccidiodomicose na forma aguda com Anfotericina B não conjugada, AmB, Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-BlaAmB, ou com as nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-Bla	40
Figura 7. Massas corpóreas dos camundongos (n=10) antes e após trinta e sessenta dias de tratamento da paracoccidiodomicose na forma	

crônica com Anfotericina B conjugada Anfotericina B não conjugada, AmB ou com as nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-Bla.....	41
Figura 8. Unidades formadoras de colônias, UFC, recuperadas de pulmão de camundongos infectados pelo fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> isolado Pb18 e tratados na forma aguda com FM-BlaAmB, AmB ou fm-Bla	42
Figura 9. Unidades formadoras de colônias, UFC, recuperadas de pulmão de camundongos infectados pelo fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> isolado Pb18 e tratados na forma crônica com FM-BlaAmB, AmB ou FM-Bla	43
Figura 10. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de pulmões de camundongo BALB/C, corados com H&E	45
Figura 11. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de pulmões de camundongo BALB/c, corados com H&E	46
Figura 12. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de fígado, baço e rim de camundongo BALB/c, corados com H&E.....	48
Figura 13. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de pulmões, rim, baço e fígado de camundongo BALB/c, corados com Perls	49
Figura 14. Padrão das citocinas IL-10 e IL-4 secretadas pelo tecido pulmonar de camundongos BALB/c tratados com AMB, FM-BlaAMB e FM-Bla na infecção crônica e aguda por 30 e 60 dias	54
Figura 15. Padrão das citocinas IL-12 e IFN- γ secretadas pelo tecido pulmonar de camundongos BALB/c tratados com AMB, FM-BlaAMB e FM-Bla na infecção crônica e aguda por 30 e 60 dias	56

Figura 16. Frequência da fragmentação de DNA, por citometria de fluxo,
30 e 60 dias após o início do tratamento – infecção aguda57

Figura 17. Frequência da fragmentação de DNA, por citometria de fluxo,
30 e 60 dias após o início do tratamento – infecção crônica 58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Caracterização físico-química das amostras de fluido magnético contendo nanopartículas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico e conjugadas ou não a Anfotericina B, utilizadas no tratamento da infecção crônica – Amostra A.....	21
Tabela II. Caracterização físico-química das amostras de fluido magnético contendo nanopartículas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico conjugado ou não a Anfotericina B, utilizadas no tratamento da infecção aguda – Amostra B	22
Tabela III. Grupos experimentais utilizados para avaliar a eficácia da Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico no tratamento da paracoccidiodomicose.....	27
Tabela IV. Níveis de Uréia, Creatinina, AST, ALT e transferrina em camundongos BALB/c após 30 e 60 dias de tratamentos com FM-BlaAmB, AMB e FM-Bla nas infecções aguda e crônica.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

- µg** - Micrograma
µL - Microlitro
µm - Micrometro
µM - Micromolar
°C - Graus Celsius
ALT - Alanina-aminotransferase
AmB - Anfotericina B deoxicolato de sodio
ANOVA - Analise de Variancia
AST - Aspartato-aminotransferase
ATCC - American Type Culture Collection
BHI - Meio Brain Heart Infusion
CEUA - Comite de Etica no Uso Animal
CL₅₀ - concentração letal 50%
CM - células mesangiais
DMSA - Acido dimercaptosuccinico
DNA - Acido Dexorribonucleico
DRX - difração de raios-X
EDTA - Acido etilenodiamino tetra-acetico
ELISA - Ensaio de Ligacao Imunoenzimatica
Fm - Fluido magnético
g - Grama
h - Hora
HE - Hematoxilina-Eosina
IFN-γ - Interferon gama
IL-10 - Interleucina 10
IL-12 - Interleucina 12
IL-2 - Interleucina 2
IL-4 - Interleucina 4
IL-5 - Interleucina 5
kg - Kilograma
L - Litro

MF-Bla – nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido laurico

MF-BlaAmB - Anfotericina B conjugada com nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido laurico

mg - Miligrama

MIC - Concentração Mínima Inibitória

mL - Mililitro

mm - Milímetro

MØ - macrófagos peritoneais,

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

mV - milivolts

nm – Nanometro

NPM – nanopartículas magnéticas

PBmicose - Paracoccidiodomicose

Pb18 - Isolado 18 de *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS - Tampão Salino Fosfato

PCM – Paracoccidiodomicose

PV – índice de polidispersão

pg – Picograma

pH - Potencial hidrogeniônico

rpm - Rotações por Minuto

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute

SBF - Soro Bovino Fetal

SEM - Desvio Padrão da Média

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

Th - Linfócitos T helpers

TNF - Fator de Necrose Tumoral

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

YPD - Meio Yeast Peptone Dextrose

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica autóctone da América Central e do Sul, de caráter endêmico entre as populações de zona rural, porém com distribuição heterogênea, havendo áreas de baixa e de alta endemicidade, Figura 01. Essa micose (Pbmicose ou PCM) acomete principalmente indivíduos do gênero masculino com idade entre 30 e 60 anos. A razão de acometimento da Pbmicose em adultos varia entre 10 a 15 homens para 1 (uma) mulher, o que não ocorre na infância, onde a infecção e a doença incidem uniformemente entre ambos os gêneros.

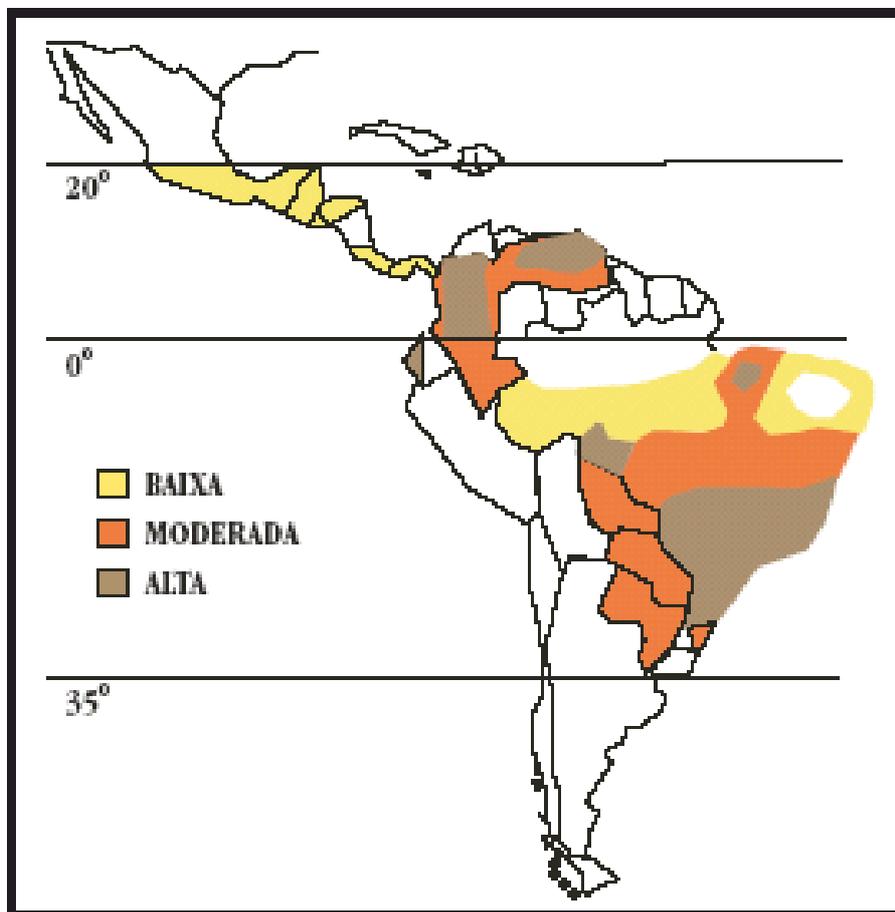


Figura 1. Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose (Shikanai-Yasuda *et alli*, 2006).

Acredita-se que 50% dos habitantes de zonas endêmicas de países como Venezuela, Colômbia, Argentina e Brasil tenham sido expostos ao agente etiológico desta micose. Entretanto, apenas 2% desses indivíduos desenvolvem alguma manifestação clínica da doença. O Brasil é o país que apresenta a maior área endêmica no mundo, com 80% dos casos da doença relatados (Brummer *et alli*, 1993; Coutinho *et alli*, 2002).

Dados demonstram que no período entre 1980 e 1995, a taxa média de mortalidade anual no Brasil pela Pbmicose foi de 1,45 mortes/milhão de habitantes (Coutinho *et alli*, 2002), confirmando essa doença como um importante agravo de saúde pública no País. Entretanto, essa taxa pode não corresponder à realidade, uma vez que a Pbmicose não faz parte das patologias de notificação compulsória para o Ministério da Saúde.

A importância da Pbmicose em saúde coletiva está ligada aos custos sociais e econômicos derivados não apenas da doença, que ocorre em indivíduos na sua fase mais produtiva de vida, mas também das frequentes sequelas secundárias a esta micose. Podendo ocasionar a incapacitação para o trabalho, além de uma grande quantidade de mortes precoces, principalmente para segmentos sociais específicos, como o de trabalhadores rurais, que além de tudo isso tem dificuldade de acesso aos serviços de saúde.

Vale ressaltar que quando não diagnosticada e tratada oportunamente, a Pbmicose pode levar a formas disseminadas da doença, afetando rápida e progressivamente os pulmões, podendo também atingir outros órgãos. Mesmo que o paciente apresente melhoras, devido ao tratamento, ele pode desenvolver fibrose pulmonar, a sequela mais grave, resultante dos processos

granulomatosos no pulmão, característicos desta doença, o que limita as atividades do indivíduo (Cock *et alli*, 2000).

Embora o agente etiológico da Pbmicose tenha sido identificado como um fungo por Adolfo Lutz já em 1908, somente os estudos de Splendore (1912) e de Almeida (1930) permitiram determinar a classificação desse fungo, que foi denominado de *Paracoccidioides brasiliensis* (Gotz, 1954). Na natureza, o *P. brasiliensis* é um fungo saprobiótico que, entre 25 e 30 °C, apresenta-se na forma filamentosa, ou seja, de um micélio multicelular, contendo propágulos infectantes chamados conídios. Uma vez inalados, por mamíferos, os propágulos dão origem a formas leveduriformes do fungo que constituirão sua forma parasitária nos tecidos do hospedeiro, comportando-se assim como um fungo termo-dimórfico (Brummer *et alli*, 1993; Gomes *et alli*, 2000). Apesar de os humanos terem sido por muito tempo considerados os únicos hospedeiros naturais desse fungo, mais recentemente alguns animais, como o tatu e o cão foram também diagnosticados como portadores da infecção pelo *P. brasiliensis* (Restrepo *et alli*, 2001; Ricci *et alli*, 2002; Marques, 2003).

Por muitos anos, acreditou-se que a infecção pelo *P. brasiliensis* acontecia devido a traumas ocasionados pelo hábito de mascar diferentes tipos de vegetais ou pelo contato do fungo com ferimentos da pele. Atualmente, sabe-se que a infecção do *P. brasiliensis* ocorre por via inalatória, de modo que os conídios alcançam porções distais da árvore respiratória, os septos alveolares. Uma vez no parênquima pulmonar os conídios passam à forma de levedura e ocorre a instalação da doença (Restrepo, 1985; McEwen *et alli*, 1985; Cock *et alli*, 2000). A partir desse foco primário pulmonar, o fungo pode disseminar, via vasos linfáticos ou sanguíneos, para diferentes órgãos tais

como a pele, o fígado, o baço, além de linfonodos e tecido linfóide associado ao tubo digestivo. Na maioria das vezes, a infecção na fase inicial é assintomática sendo detectada apenas por teste intradérmico ou por achado de necropsia (Silva & Telles Filho, 2006).

A progressão da infecção resulta em duas formas clínicas: a forma aguda ou subaguda, tipo juvenil, e a forma crônica, tipo adulto (Montenegro, 1986; Brummer *et alli*, 1993; Marques, 2003). O tipo juvenil é a forma mais grave da doença e é responsável por 3 a 5% dos casos, predominando em crianças e adolescentes, independente do gênero. Esta forma caracteriza-se por uma evolução mais rápida da doença e pelo envolvimento do sistema mononuclear fagocitário encontrado principalmente no fígado, nos linfonodos e no baço; nesse caso o pulmão é raramente afetado. Vale ressaltar que, em biópsias dos tecidos afetados, apesar de ser comum a presença de muitas células de *P. brasiliensis* em proliferação, é raro a presença de granulomas (Montenegro, 1986; Brummer *et alli*, 1993; Marques, 2008); a formação do granuloma é reconhecida como um potente mecanismo para destruir esse patógeno, evitando assim a disseminação da doença (Brummer *et alli*, 1993; Cock *et alli*, 2000).

A forma crônica da Pbmicoose representa 90% dos casos e é mais frequente em homens que se encontram na terceira década de vida. A evolução desta forma clínica é lenta, silenciosa, e leva de vários meses a anos para se estabelecer; as manifestações mais evidentes são as pulmonares, principalmente granulomas, ocorrendo em 90% dos adultos doentes, sendo que em 25% deles os pulmões são os únicos órgãos afetados.

A lentidão para a manifestação da doença pode levar o paciente a procurar ajuda médica somente quando as manifestações são visíveis, ou seja, quando outras regiões do organismo como a mucosa bucal ou a pele, estão afetadas (Montenegro, 1986; Brummer *et alli*, 1993, Shikanai-Yasuda *et alli*, 2006). Os linfonodos, as glândulas suprarrenais, os intestinos e os órgãos do sistema nervoso central também são frequentemente afetados quando a infecção já é sistêmica. Entretanto, embora com menor frequência, o sistema ósteo-articular, o fígado, o baço, a próstata, os órgãos genitais, a tireoide, o globo ocular, a artéria aorta e o pericárdio também podem ser acometidos. Mesmo que os indivíduos sejam submetidos a um tratamento, nesta fase algumas sequelas podem permanecer, dentre as mais limitantes inclui-se quadros de insuficiência pulmonar crônica, doença de Addison e linfangiectasia com má-absorção intestinal (Palmeiro *et alli*, 2005).

Além das sequelas acima citadas, pode ocorrer recidiva da doença. Isso acontece quando há a liberação de células de *P. brasiliensis* do interior de granulomas. Logo no início da sua formação, os granulomas são compactos e neles não ocorre proliferação das células fúngicas. Porém, à medida que eles vão se desintegrando, as células fúngicas voltam a proliferar e ocorre a recidiva da doença (Brummer *et alli*, 1993; Cock *et alli*, 2000). Desse modo, pode-se afirmar que os granulomas constituem estruturas capazes de conter a disseminação do fungo e estão intimamente relacionados à resposta imune do hospedeiro (de Camargo e de Franco, 2000; Arruda *et alli*, 2004).

O diagnóstico definitivo desta micose é determinado pela detecção do agente etiológico em fluidos ou tecidos biológicos por meio de, principalmente, exame micológico direto e/ou histopatológico. Na histopatologia do granuloma

são encontrados agregados nodulares de macrófagos circundados por linfócitos T e, frequentemente, acompanhados por células epitelioides multinucleadas, que são macrófagos diferenciados pela influência das citocinas IL-12 e IFN- γ (de Camargo e de Franco, 2000; Arruda *et alli*, 2004). Para acompanhamento terapêutico e diagnóstico de recidiva da doença são realizados exames sorológicos como a titulação de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*.

Apesar da evolução da infecção depender da relação entre a virulência do fungo e da habilidade deste em interagir com células do hospedeiro e invadi-las, a resposta imunológica do hospedeiro é o principal fator para o estabelecimento da doença (de Camargo e de Franco, 2000; Calich *et alli*, 2008). Citocinas como o Interferon gama – IFN- γ e o fator de necrose tumoral alfa – TNF- α , que ativam macrófagos e linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, induzem a formação de granulomas compactos, o que dificulta a progressão da doença. Assim, quando indivíduos infectados produzem as citocinas IFN- γ e TNF- α , significa que eles desenvolveram uma resposta contra o fungo medida por linfócitos T auxiliar do tipo 1, Th1, o que lhes proporciona resistência à progressão da infecção (Oliveira *et alli*, 2002; Calich *et alli*, 2008).

Por outro lado, os indivíduos que respondem a infecção com maior ativação de linfócitos B e, subsequentemente produção de altos títulos de anticorpos específicos e de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10, ou seja, que desenvolvem resposta imune medida por linfócitos T auxiliar do tipo 2, Th2, nesse caso a infecção evolui e a doença se estabelece (de Camargo e de Franco, 2000; Kashino *et al*, 2000; Oliveira *et alli*, 2002; Shikanai-Yasuda, 2006). A propensão para a persistência do fungo em tecidos infectados parece

ser consequência da desregulação da imunidade celular com uma supressão da resposta do tipo Th1 e superexpressão da resposta do tipo Th2.

Diferentemente de outros fungos patogênicos, o *P. brasiliensis* é sensível à maioria das drogas antifúngicas, por conseguinte, vários antifúngicos são utilizados no tratamento da Pbmicose (Shikanai-Yasuda *et alli*, 2006). A escolha da droga a ser utilizada é feita de acordo com o estado do paciente e requer, além de um período de tratamento longo, o monitoramento do paciente de modo a avaliar sua eficácia e a tolerância ao antifúngico (Hahn *et alli*, 2003). Dentre os fármacos mais utilizados destacam-se o Itraconazol e a Anfotericina B (Brummer *et alli*, 1993).

A Anfotericina B, Figura 2, é um fármaco pertencente à classe dos antibióticos poliênicos (caracterizam-se por um amplo anel contendo um grupo funcional de lactona e uma sequência de duplas ligações conjugadas) e é produzida pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. As propriedades fungicidas desta molécula foram identificadas por Gold e colaboradores em 1956 e desde então ela tem sido a droga de escolha para o tratamento da maioria das micoses sistêmicas (Lemke *et alli*, 2005; Ruijgrok *et alli*, 2006).

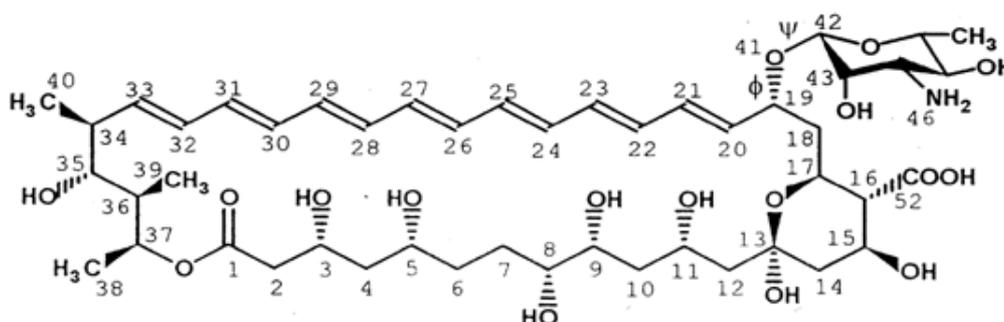


Figura 2: Estrutura química do fármaco Anfotericina B. Adaptado de Carrillo-Muñoz *et alli*, 2006.

O mecanismo de ação da Anfotericina B e da maioria dos polienos, ocorre pela interação direta com o ergosterol, o esteroide mais abundante nas membranas celulares do *P. brasiliensis*, por meio de interações hidrofóbicas, o que induz a formação de poros aquosos na membrana plasmática do fungo desencadeando assim a sua morte (Andreoli & Monahan, 1968; Ghannoum & Rice, 1999; Gruszecki *et alli*, 2003). Apesar de se ligar preferencialmente ao ergosterol, a Anfotericina B também se liga ao colesterol (Hsuchen & Feingold, 1973; Kotler-Brajtburg *et alli*, 1974; Yilma *et alli*, 2006), o esteroide mais abundante nas membranas das células de mamíferos (Ghannoum & Rice, 1999; Baginski *et alli*, 2005).

Em casos graves da Pbmicosose ou quando ocorre resistência aos outros antifúngicos (Shikanai-Yasuda *et alli*, 2006), a Anfotericina B é administrada aos pacientes na dose de 1mg/kg/dia. Esse fármaco possui amplo espectro antifúngico, potente atividade fungicida e episódios raros de resistência, o que contribui para o sucesso clínico desta droga (Baginski *et alli*, 2005). No entanto, a Anfotericina B induz diversos efeitos adversos, sendo considerado um dos antibióticos mais tóxicos para os humanos (Guo, 2001; Ostrosky-Zeichner *et alli*, 2003; Lemke *et alli*, 2005), havendo, muitas vezes, a necessidade de hospitalização durante a administração dessa droga para o adequado monitoramento do paciente (Atkinson & Bennett, 1978; Brummer *et alli*, 1993; Fukui *et alli*, 2003b). Os efeitos adversos mais frequentes são náuseas, vômito, febre, dor de cabeça, hipotensão, dano hepático, anemia e principalmente nefrotoxicidade (Guo, 2001; Ostrosky-Zeichner *et alli*, 2003; Lemke *et alli*, 2005; Bicanic *et alli*, 2008).

A incidência de nefrotoxicidade induzida pela Anfotericina B é tão alta, que chega a afetar de 49 e 65% dos pacientes (Wingard, 1999; Deray, 2002), e ocorre devido à ligação da Anfotericina B com o colesterol das membranas celulares dos túbulos contorcidos dos néfrons (Atkinson & Bennett, 1978; Baley *et alli*, 1990; Fukui *et alli*, 2003), criando um canal iônico nessas membranas que permitem o fluxo de íons e de pequenas moléculas intracelulares. Com a saída desses íons, principalmente do potássio, ocorre o comprometimento do metabolismo celular (Santin *et alli*, 2006). O acúmulo de íons potássio no sangue, hipercalemia, pode induzir quadros graves de arritmia cardíaca (Groot *et alli*, 2008). Os níveis séricos elevados da droga contribuem para aumentar esses efeitos toxicológicos, pois quanto maior a quantidade de droga livre circulante, mais danos causará aos rins.

Com o intuito de reduzir os efeitos adversos induzidos pela Anfotericina B durante o tratamento da paracoccidioidomicose, novas estratégias estão sendo desenvolvidas na formulação desta droga. Entre elas destaca-se a sua conjugação com fosfolipídeos (lipossomas) ou detergentes (micelas), ou seja, formulações que utilizam carreadores de natureza lipídica (Ng *et alli*, 2003) aos quais podem ser conjugadas substâncias com afinidades específicas por determinados sítios e órgãos, levando assim a droga ao sítio de ação desejado. Este tipo de estratégia tem a vantagem de diminuir a concentração da droga livre no plasma sanguíneo e de aumentar a sua concentração no local desejado para a terapia (Wills *et al.*, 2000; Kleinberg, 2006). Atualmente três formulações lipídicas estão disponíveis comercialmente: Abelcet® - complexo lipídico com tamanho de 1,6 a 11,1 µm, Amphotec® - dispersão coloidal com tamanho de 115 nm e Ambisome® - lipossomal com tamanho de 45 a 80 nm.

Embora essas formulações sejam indicadas como terapia de primeira linha em pacientes afetados por micoses sistêmicas cujas funções renais estejam comprometidas – nesses pacientes foi observada uma considerável redução dos efeitos nefrotóxicos (Bowden *et alli*, 2002; Walsh *et alli*, 2004; Alexander e Wingard, 2006) – no Brasil essas formulações são muito caras, por serem protegidas por patentes, o que torna relevante o desenvolvimento de formulações alternativas. Assim, a utilização de fármacos ligados a estruturas biocompatíveis passa a ser uma nova estratégia para a entrega de drogas no tratamento de doenças. Nesse sentido, destacam-se os materiais nanoestruturados.

A nanobiotecnologia envolve o desenvolvimento e a pesquisa de nanomateriais para aplicações terapêuticas e de diagnóstico. Os materiais nanoestruturados se caracterizam por dimensões nanométricas, sendo que 1 nanômetro (nm) equivale a bilionésima parte de um metro (Moghimi *et alli*, 2005).Dentre esses materiais nanoestruturados utilizados na área biomédica, as nanopartículas magnéticas (NPM) têm se destacado por apresentarem características tais como: alta proporção na relação superfície/volume e capacidade de responder a um gradiente de campo magnético. Além disso, pelo fato de estarem em escala nanométrica, essas NPM se comportam como partículas superparamagnéticas, ou seja, não retém magnetismo após a remoção do campo magnético (Berry & Curtis, 2003; Gupta & Gupta, 2005; Xie *et alli*, 2009; Yu *et alli*, 2010). Freeman e colaboradores (1970) foram os primeiros a introduzir o conceito de uso de magnetismo em medicina. Desde então, muita pesquisa tem sido feito nesta área, levando à concepção de várias partículas magnéticas e vetores.

As NPM são compostas por elementos como o cobre, cobalto, níquel, manganês, e mais frequentemente por ferritas como magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Sun *et alli*, 2004).

As ferritas, quando dispersas em soluções coloidais, constituem fluidos magnéticos, FM, que são suspensões estáveis de nanopartículas magnéticas, geralmente com diâmetro que varia entre 5 e 15 nm, em solventes carreadores orgânicos ou inorgânicos (Massart, 1982). Nessas suspensões, as interações partícula-líquido são fortes o bastante para que o seu comportamento magnético seja transmitido ao líquido como um todo (Rosensweig, 1985).

Quando pensamos em um sistema de entrega de drogas que tenha resultados satisfatórios devemos considerar algumas características essenciais quando falamos de nanopartículas magnéticas como tamanho, forma e cobertura. Tais propriedades estão envolvidas principalmente com o perfil de distribuição e toxicidade dessas nanopartículas.

A forma das nanopartículas influencia no tempo de permanência na circulação sanguínea, biodistribuição e biocompatibilidade das mesmas. Huang e colaboradores (2011) estudaram o efeito da forma da nanopartículas de sílica em um sistema *in vivo*. Eles observaram que nanopartículas de sílica mais ou menos esféricas se acumulam no fígado, enquanto que nanopartículas de sílica em forma de bastão se acumulam no baço. Além disso as nanopartículas esféricas apresentavam taxas de depuração rápida através da urina e das fezes. O mesmo foi observado por Mahmoudi e colaboradores (2009) na qual nanopartículas que tinham a forma esférica apresentavam maior toxicidade em relação a nanopartículas em forma de bastões e clustes coloidais de nanocristais.

Assim como a forma, o tamanho das nanopartículas determina o tempo de permanência na circulação sanguínea. Por exemplo, nanopartículas com tamanhos inferiores a 10nm, são essencialmente removidos por depuração renal, enquanto que partículas maiores que 200nm se concentram no baço ou são absorvidas pelas células fagocíticas do corpo, em ambos os casos conduzindo a concentrações plasmáticas. Contudo nanopartículas que se encontram na faixa de 10 a 100nm apresentam o melhor tempo de circulação no organismo, pois geralmente conseguem escapar do sistema reticulo-endotelial e penetrar em capilares (Gupta & Wells, 2004).

As nanopartículas que constituem os FM tendem a se aglomerar por atração magnética dipolar-dipolar. Do ponto de vista da estabilidade coloidal os fluidos são classificados de três maneiras: iônicos, quando a estabilidade coloidal é controlada por uma maior ou menor repulsão eletrostática entre as nanopartículas; surfactantes, quando as NPM são recobertas por uma camada molecular, que pode ser de cadeias carbônicas, relativamente longas, ou ainda iônico-surfactantes, quando a estabilidade é controlada tanto pela repulsão eletrostática entre as NPM quanto pelo seu recobrimento molecular. A carga da superfície das nanopartículas determina a sua biodistribuição e afeta a interiorização das mesmas nas células alvo. Onde nanopartículas com carga positiva geralmente apresenta maior interiorização por células de câncer de mama em humano do que as carregadas negativamente (Mahmoudi et alii, 2011).

A cobertura também é essencial pois reduz a tendência de aglomeração das partículas não revestidas, melhorando assim a sua capacidade de dispersão e estabilidade coloidal; protege a superfície contra oxidação;

proporciona uma superfície para a conjugação de moléculas de droga; aumenta o tempo de circulação sanguínea, evitando apuramento pelo sistema reticuloendotelial; torna as partículas biocompatível e minimiza as interações não específicas, o que reduz a toxicidade e aumentar a sua eficiência de internalização pelas células alvo.

Entretanto, para a utilização das nanopartículas magnéticas na biomedicina é necessário vencer desafios como o de tornar estas nanopartículas biocompatíveis, ou seja, tornar o FM biodegradável, hemocompatível e que não seja tóxico ao organismo. Para tal, é importante que a cobertura estabilizante utilizada durante a sua síntese seja também um material biocompatível. NPM de óxidos de ferro continuam a atrair atenção devido à sua baixa toxicidade, excelente biocompatibilidade e, pelo fato de que podem ser metabolizados pela heme-oxigenase-1, para formar hemoglobina e consequentemente, manter a homeostase de ferro pelas células (Pradhan, 2007; Corchero, 2009).

Diante disto, o nosso grupo vem testando a biocompatibilidade e a biodistribuição de nanopartículas magnéticas recobertas por diferentes substâncias estabilizantes, como a dextrana (Lacava *et alli*, 2002 e 2003), o ácido cítrico (Garcia, 2002), o álcool etoxilato e o ácido dodecanóico (Freitas *et alli*, 2002), o ácido glucônico (Barbosa, 2004), o ácido poliaspártico (Sadeghiani *et alli*, 2005), o ácido dimercaptosuccínico - DMSA (Chaves *et alli*, 2002 e 2005; Garcia *et alli*, 2005; Parca, 2006; Braz, 2008; Monge-Fuentes *et alli*, 2009), polímeros de albumina (Saldanha, 2007; Estevanato *et alli*, 2011) e recentemente testou-se nanopartículas magnéticas recobertas por ácido láurico em bicamada.

A aplicação de sistemas nanoparticulados assume importância considerável à medida que eles permitem uma maximização do efeito terapêutico da droga, minimiza seus efeitos adversos, como mostrado por vários autores. A exigência principal neste sistema é de que o fármaco deve ser carregado de modo que a sua funcionalidade não seja comprometida. Além disso, essas nanopartículas conjugadas com o fármaco também devem liberá-lo no local apropriado e com a dose desejada.

Os sistemas de entrega de drogas por meio de nanopartículas possuem vantagens sob o convencional como: eficácia terapêutica com liberação progressiva e controlada; diminuição toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; direcionamento a alvos específicos; menor número de doses; e incorporação de moléculas bioativas hidrofóbicas e hidrofílicas (Camilo, 2006).

Diante disso, Lübbe e colaboradores (1996) testaram em 14 pacientes com câncer de mama um ferrofluido acoplado à droga quimioterápica epidoxorrubicina e, apesar de terem obtido resultados de boa tolerância e aplicabilidade do sistema, os autores sugerem que sejam feitas melhorias no mecanismo de liberação da droga devido ao efeito tóxico dose dependente. Nesta mesma linha, Mykhaylyk e colaboradores (2005) desenvolveram um veículo nanomagnético ligado a doxorrubicina que, quando sob a ação de um campo magnético estacionário não uniforme, possibilitou maior disponibilidade da substância no sangue, o que permitiu modular a sua farmacocinética. O mesmo ocorreu com Tong e colaboradores (2011), que mostraram que a gemcitabina encapsulada por nanopartículas magnéticas e polietilenoglicol na forma lipossomal inibiu crescimento tumoral em camundongos.

De forma bastante similar, Jain e colaboradores (2005) mostraram que nanopartículas magnéticas estabilizadas por ácido plurônico e ácido oleico quando conjugadas ao quimioterápico doxorrubicina permitiram maior retenção intracelular desse quimioterápico e sugeriram inclusive o uso dessas NPM estabilizadas por ácido plurônico e ácido oleico na veiculação sistêmica de agentes hidrofóbicos. Mais recentemente, Estevanato e colaboradores (2011) mostraram em modelo murino que nanoesferas de albumina magnética apresentavam biocompatibilidade *in vivo* e se aglomeravam no sistema nervoso central, apresentado potencial para serem utilizadas como um sistema de entrega de drogas.

A utilização de nanopartículas como sistema de entrega de drogas para o pulmão tem sido objeto de diversos estudos. Niven e colaboradores (1995) e Sung e colaboradores (2007) demonstraram que a fagocitose de nanopartículas por macrófagos alveolares pode ser reduzida se as partículas forem menores que 260 nm.

Nos estudos já realizados quanto à biodistribuição e biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas recobertas com diferentes substâncias estabilizantes observou-se que, de modo geral, o pulmão é um dos órgãos preferencialmente depositário dessas NPM para a maioria das coberturas estabilizantes, sendo que em alguns casos, quando a cobertura estabilizante é o ácido dimercaptosuccínico, DMSA, ou o ácido láurico, há inicialmente uma resposta inflamatória leve causada pela deposição das mesmas nesse órgão, mas que em longo prazo desaparece (Chaves *et alli*, 2002; Garcia *et alli*, 2005), sugerindo assim, que essas nanopartículas magnéticas, uma vez conjugadas com drogas específicas, poderiam ser utilizadas no tratamento de doenças

pulmonares, como a paracoccidioidomicose. Tendo em vista esses dados, e a fim de desenvolver um sistema controlado de entrega de drogas assim como de reduzir os efeitos adversos da Anfotericina B, conjugou-se nanopartículas magnéticas estabilizadas com ácido láurico a moléculas desse fármaco para utilizar no tratamento da Paracoccidioidomicose.

2. OBJETIVO GERAL

Considerando os relatos da literatura sobre os efeitos da Anfotericina B no organismo e as aplicações biomédicas dos fluidos magnéticos, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico (FM-BlaAmB) no tratamento da paracoccidiodomicose experimental.

Para tal foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- determinar a concentração mínima inibitória do fármaco FM-BlaAmB contra o fungo *P. brasiliensis*;
- avaliar a citotoxicidade do fármaco FM-BlaAmB em células de mamíferos, *in vitro*.
- avaliar a toxicidade do fármaco FM-BlaAmB em camundongos BALB/c;
- avaliar a genotoxicidade do fármaco FM-BlaAmB em camundongos BALB/c;
- avaliar a eficácia do fármaco FM-BlaAmB no tratamento da paracoccidiodomicose;
- avaliar se o fármaco FM-BlaAmB interfere na resposta imunológica dos camundongos frente ao *P. brasiliensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostra

Nanopartículas de magnetita (Fe_2O_3) de uma amostra de fluido magnético foram estabilizadas com uma bicamada de ácido láurico e conjugadas com o fármaco Anfotericina B - FM-BlaAmB. Neste estudo foram utilizadas duas amostras de FM-BlaAmB sintetizadas e caracterizadas pela equipe da Dra. Emília Celma de Oliveira Lima, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. As tabelas I e II ilustram as características físico-químicas dessas amostras, sendo que as amostras da tabela I foram utilizadas no tratamento da infecção crônica da Pbmicose induzida em camundongos, e as amostras da tabela II foram utilizadas no tratamento da infecção aguda. Como controle foi utilizado nanopartículas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico sem Anfotericina B - FM-Bla.

Tabela I. Caracterização físico-química das amostras de fluido magnético contendo nanopartículas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico e conjugadas ou não a Anfotericina B, utilizadas no tratamento da infecção crônica – Amostra A.

Caracterização	FM-BlaAmB	FM-Bla
[Fe] (mg/mL)	1,74	1,52
Diâmetro hidrodinâmico (nm)	84,8	77,7
Potencial Zeta (mV)	-22,8	-15,3
Concentração de AnfotericinaB (mg/mL)	1,02	-
Número de partículas / mL de fluido	$2,607 \times 10^{15}$	$1,9364 \times 10^{15}$
Diâmetro médio – DRX	9,13	9,13
Diâmetro médio - MET (nm) / Índice de polidispersão (PD)	7,10/0,278	6,10/0,358

Tabela II. Caracterização físico-química das amostras de fluido magnético contendo nanopartículas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico conjugado ou não a Anfotericina B, utilizadas no tratamento da infecção aguda – Amostra B.

Caracterização	FM-BlaAmB	FM-Bla
[Fe] (mg/mL)	0,90	0,90
Diâmetro hidrodinâmico (nm)	137,00	136
Potencial Zeta (mV)	-21,30	-21,00
Concentração de AnfotericinaB (mg/mL)	0,76	-
Número de partículas / mL de fluído	$1,95 \times 10^{14}$	$1,99 \times 10^{14}$
Diâmetro médio – DRX (nm)	13,00	13,00

3.2. Estudos *in vitro*

Estes estudos foram realizados de modo a avaliar se a Anfotericina B quando conjugada com as nanopartículas manteria a sua atividade antifúngica e se seria citotóxica para células de mamíferos.

3.2.1. Linhagens celulares

Para avaliar a atividade antifúngica da Anfotericina B conjugada com as nanopartículas foi utilizado o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e para avaliar a citotoxicidade dessa formulação do fármaco sobre as células de mamíferos foram utilizadas células mesangiais humanas e macrófagos peritoneais de camundongos.

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* utilizado, isolado virulento 18 (Pb18), é parte da coleção de fungos do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília onde é mantido em meio de cultura sólido. As células mesangiais humanas foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, EUA) e mantidas no Laboratório de Nanotecnologia da Universidade de Brasília. Já os macrófagos foram obtidos do peritônio de camundongos BALB/c.

3.2.2. Manutenção das linhagens celulares

3.2.2.1. *Paracoccidioides brasiliensis*

Para ser utilizado nos experimentos deste estudo, o fungo passou a ser mantido em meio de cultura líquido, meio YPD (yeast 10g, dextrose 20 g, peptona bacteriológica 20 g, água destilada 1L), a 36 °C sob agitação (220 rpm). Após cinco dias de cultivo, a cultura foi centrifugada a 918.4 g durante 10 minutos e o precipitado ressuspensão em tampão fosfato salino (PBS) estéril (pH 7,4). As células fúngicas foram então coradas com uma solução de Verde-Janus 0,05% (Merck, Alemanha) e a viabilidade foi determinada ao microscópio de luz. A análise da viabilidade visava quantificar o número de células fúngicas a ser utilizado nos experimentos.

3.2.2.2. Células de mamíferos

As células mesangiais humanas, CM, foram mantidas em meio de cultura DMEM (GIBCO-BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino - SFB (GIBCO-BRL), 1% de penicilina-estreptomicina, tamponado com bicarbonato de sódio, sendo o pH 7,4 ajustado pela adição de ácido clorídrico (HCl). As culturas foram estabelecidas a partir de uma passagem inicial de 2×10^5 células em frascos de cultura de 75 cm² e mantidas em estufa a 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada.

Uma vez atingido 80-90% de confluência, as células foram liberadas do fundo do frasco de cultura por tratamento com solução de Tripsina 0,125%/EDTA 0,02% (GIBCO, Auckland, NZ) por dois minutos, centrifugadas a 175 g por cinco minutos, contadas em câmara de Neubauer e transferidas 2×10^5 células para novo frasco de cultura.

Para obtenção de macrófagos peritoneais, MØ, camundongos BALB/c foram sacrificados por deslocamento cervical. Imediatamente após o deslocamento cervical realizou-se a incisão longitudinal mediana abdominal na pele dos animais, sem perfurar o peritônio. Em seguida, foram administrados quatro mililitros de PBS estéril na cavidade peritoneal e após ligeira massagem na região abdominal do animal removeu-se o lavado peritoneal com o auxílio

de uma pipeta Pasteur. A suspensão de células foi centrifugada a 400 g por cinco minutos e a 4 °C, e em seguida, em uma câmara de fluxo laminar, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de solução de lise de hemácias com pH entre 7,2 e 7,4 (NH₄Cl 150 mM, NaHCO₃ 10mM e Na₂EDTA 0,1 mM em água nanopura a 4 °C) e centrifugado novamente a 400 g, a 4 °C por cinco minutos. Após esse tempo, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em PBS estéril a 4 °C. Este procedimento foi realizado duas vezes. Ao final, as células foram ressuspendidas em meio de cultura *Park Memorial Institute* – RPMI1640 (Invitrogen) completo, ou seja, com 10% de SFB e 1% de antibiótico (100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Este procedimento teve a aprovação do comitê de ética do uso animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

3.2.3. Concentração mínima da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico necessária para inibir o crescimento do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

De modo a determinar a concentração inibitória mínima (MIC – do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) da amostra FM-BlaAmB necessária para inibir o crescimento do fungo *P. brasiliensis*, 2×10^4 células fúngicas viáveis/100µL foram cultivadas em meio de cultura RPMI1640 (Invitrogen), conforme o protocolo M27-A2 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). Ao meio de cultura foram acrescentados 100 µL dos tratamentos diluídos nas seguintes concentrações de Anfotericina B contidas na amostra FM-BlaAmB: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 128 µg/mL. As células foram então incubadas a 36 °C por três dias, sob agitação de 40 rpm. Após este período, de cada poço foram retirados 100 µL que foram repassados para placas de Petri contendo meio sólido de infusão de cérebro e coração (BHI, Acumedia[®], EUA) suplementado com 4% (v/v) de soro de cavalo (Gibco, EUA), 5% (v/v) do sobrenadante filtrado da cultura do isolado Pb192 e 40mg/L de gentamicina (Schering-Plough, EUA). O filtrado foi preparado de acordo com metodologia descrita anteriormente por Singer-Vermes e colaboradores (1992). As células fúngicas foram então incubadas a 36 °C, sob

agitação (220rpm) durante cinco dias. Após esse tempo, realizou – se a contagem das unidades formadoras de colônia dos fungos (UFC). Este ensaio, MIC, foi realizado em dois experimentos independentes (duplicata biológica), cada um deles em duplicata (duas repetições técnicas).

Como controles foram utilizados (1) Anfotericina B desoxicolato de sódio (SIGMA® - 45% de Anfotericina B) sem estar conjugada com as nanopartículas, nas mesmas concentrações utilizadas para FM-BlaAmB; (2) nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico sem a Anfotericina B, FM-Bla. A diluição de FM-Bla teve como base a concentração de ferro correspondente contida em cada diluição de FM-BlaAmB que variava de 0,21 µg/mL a 13,64 µg/mL.

3.2.4. Análise da toxicidade da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico em células de mamíferos

A citotoxicidade da amostra FM-BlaAmB foi analisada em CM e MØ, por meio do método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Esse método de avaliação da viabilidade celular tem sido amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de nanocompostos (Ahmadian *et alli*, 2009).

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio–MTT– é uma substância amarela que, quando interiorizada por células eucarióticas, é reduzida por enzimas mitocondriais – especialmente pela succinil desidrogenase – ao formazam, uma substância insolúvel em meio aquoso e que possui coloração púrpura intensa. Vale ressaltar que apenas células eucarióticas viáveis, com mitocôndrias ativas, reduzem o MTT, de maneira que a colorimetria do formazam permite estimar a viabilidade celular (American Type Culture Collection, 2001) (Mosmann, 1983).

Para este ensaio, células CM e MØ (1×10^5 células) foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato com meio de cultura contendo FM-BlaAmB em diluições seriadas de 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 µg/mL. A escolha dessas diluições teve como base a concentração de Anfotericina B contida no

complexo e o resultado obtido no experimento da concentração mínima inibitória.

Como controle, células foram cultivadas na presença de Anfotericina B desoxicolato de sódio (SIGMA[®] - 45% de Anfotericina B) nas mesmas concentrações utilizadas para FM-BlaAmB e células cultivadas com uma solução contendo nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico sem a Anfotericina B (FM-Bla), A diluição de FM-Bla foi baseada na quantidade de concentração de ferro correspondente contida em cada diluição de FM-BlaAmB. As células foram incubadas por 6, 12 e 24 horas, a 37 °C, em atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

Após o tempo de incubação o meio de cultura foi removido e acrescentou-se a cada um dos poços 150 µL de solução de MTT em meio de cultura (1mg/mL). Seguiu-se a incubação a 37 °C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Após três horas, removeu-se a solução de MTT e adicionou-se a cada poço 50 µL de DMSO para solubilização dos cristais do formazan. A quantificação do formazan foi realizada pela medida do espectro de absorvância com comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Spectramax (Molecular Devices, EUA) conjugado à leitora de microplacas. Este ensaio foi realizado em dois experimentos independentes (duplicata biológica), cada um deles em triplicata (três repetições técnicas).

3.3. Ensaio *in vivo*

3.3.1. Modelo Animal

O modelo animal utilizado neste estudo foi constituído de camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com idade entre seis e oito semanas. Esses animais foram adquiridos do biotério da Universidade de Campinas - UNICAMP e mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB em temperatura controlada (aproximadamente 23 °C) e ciclo de claro e escuro a cada 12 horas e fornecimento de água e ração *ad libitum*. Este procedimento teve a aprovação do comitê de ética do uso animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

3.3.2. Estabelecimento da Paracoccidioidomicose

Neste estudo para a indução da doença, a infecção foi realizada por via intratraqueal. Para isso os animais foram anestesiados, intramuscularmente, com uma solução de Ketamina e Xilazina (1:1) e seus pescoços foram hiperextendidos para a exposição da traqueia ao nível da tireoide. Desse modo cada animal era inoculado, via intratraqueal, com 100 µL de suspensão de 3×10^6 células viáveis de *P. brasiliensis* em cada mL de PBS estéril - pH 7,4.

Para confirmar o estabelecimento da paracoccidioidomicose, após 30 dias da infecção um animal foi morto, por deslocamento cervical, e seus pulmões retirados e submetidos à análise histopatológica e determinação da carga fúngica.

3.3.3. Grupos Experimentais

Os camundongos foram separados em grupos experimentais, conforme descritos na Tabela III.

Tabela III. Grupos experimentais utilizados para avaliar a eficácia da Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico no tratamento da paracoccidioidomicose.

Grupos experimentais (n=10 em cada grupo)	Forma da infecção	Tratamentos			
		PBS* (µL)	AmB** (µg/µL) ¹	FM-Bla* (µg/µL) ²	FM-BlaAmB* (µg/µL) ³
	Aguda				<i>Amostra B</i>
Controle (-)	-	80	-	-	-
Controle (+)	+	80	-	-	-
AmB	+	-	40/100	-	-
FM-Bla	+	-	-	95/80	-
FM-BlaAmB	+	-	-	-	61/80
	Crônica				<i>Amostra A</i>
Controle (-)	-	60	-	-	-
Controle (+)	+	60	-	-	-
AmB	+	-	40/100	-	-
FM-Bla	+	-	-	104/80	-
FM-BlaAmB	+	-	-	-	61/60

*instilação nasal ; ** via intra-peritoneal; (1) concentração de Anfotericina B diluída em solução injetável estéril; (2) concentração de ferro contida no fluido; (3) concentração de Anfotericina associada ao fluido. A concentração de FM-Bla administrada aos animais teve como base a concentração de ferro correspondente contida no fluido MF-BlaAmB.

Nos tratamentos FM-BlaAmB e FM-Bla, as amostras foram administradas aos animais por instilação nasal, a cada três dias. Já a Anfotericina B (Anforecin B[®], Cristália) sem estar conjugada às nanopartículas

(AmB) foi administrada diariamente aos animais intraperitonealmente. Na clínica a Anfotericina B é aplicada por infusão endovenosa lenta, durante um período de duas a seis horas. Para facilitar a aplicação nos camundongos foi utilizada a via intraperitoneal que de acordo com a literatura tem mostrado eficiência terapêutica (Amaral *et alli*, 2009; Souza, 2012). Os tratamentos iniciaram 24 horas (forma aguda da doença) ou 30 dias (forma crônica da doença) após a inoculação do fungo e administrados até o 60º dia (forma aguda da doença) e o 90º dia (forma crônica da doença).

Cinquenta por cento dos animais que apresentavam a forma aguda da doença eram sacrificados, por deslocamento cervical, trinta e um dias após a infecção, os outros cinquenta por cento foram sacrificados sessenta e um dias após a infecção. Já os animais que apresentavam a forma crônica da doença cinquenta por cento foram sacrificados sessenta e um dias após a infecção, os outros cinquenta por cento foram sacrificados noventa e um dias após a infecção.

3.3.4. Avaliação Clínica

Na avaliação clínica dos camundongos utilizados neste estudo, foram considerados dois parâmetros: alterações na aparência física e variação da massa corporal. Para verificar se ocorreram variações na massa corporal os mesmo foram pesados antes e ao final dos tratamentos.

3.3.5. Obtenção dos órgãos e tecidos

Vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram devidamente anestesiados e 1 mL de sangue foi coletado por capilaridade ocular e utilizado para realizar dosagens bioquímicas (executados em parceria com o Sabin - Laboratório Clínico – para detalhes ver item 3.3.6.). Em seguida os animais foram mortos por deslocamento cervical e os órgãos baço, pulmão, fígado e rim foram removidos para avaliação histopatológica.

Parte dos pulmões foi processada para determinação da carga fúngica e quantificação de citocinas. Para tanto, fragmentos dos pulmões foram pesados e macerados e homogeneizados em 1 mL PBS estéril gelado.

De cada animal também foram coletados os fêmures para a retirada da medula óssea de modo a ser realizado o ensaio de genotoxicidade.

3.3.5.1. Determinação da carga fúngica nos pulmões dos camundongos

De modo a verificar a eficácia do complexo FM-BlaAmB no tratamento da paracoccidiodomicose determinou-se a carga fúngica nos pulmões dos camundongos. Para isso, parte do homogenato de pulmão, obtido conforme descrito no item 3.3.5., foi plaqueado em placas de Petri contendo meio de cultura sólido Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia[®], EUA) suplementado com 4% (v/v) de soro de cavalo (Gibco, EUA), 5% (v/v) do sobrenadante filtrado da cultura do isolado Pb192 e 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough, EUA). As unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas no 7^o dia após o plaqueamento dos macerados e incubação a 36 °C. Este ensaio foi realizado em duplicata técnica.

3.3.5.2. Análise histopatológica dos pulmões dos animais com paracoccidiodomicose

Este ensaio foi realizado de modo a verificar se o complexo FM-BlaAmB foi eficaz no tratamento da paracoccidiodomicose e sua possível toxicidade ao órgão. Para tal, fragmentos de pulmões foram fixados com paraformaldeído 4% tamponado, por três horas, à temperatura ambiente. Após a fixação inicial, os órgãos foram colocados em uma solução de álcool 70% e deixados à temperatura ambiente durante a noite. Depois disso, os fragmentos de órgãos foram impregnados em resina paraplástica (Histosec[®], Merck, Alemanha) em um processador automático de tecidos (OMA[®] DM-40, São Paulo, Brasil). Depois de realizada a impregnação os fragmentos foram colocados em barras de Leuckhart com resina paraplástica derretida para obtenção de blocos a serem utilizados na microtomia. Desse modo foram realizados cortes histológicos semi-seriados de 5 µm de espessura utilizando-se um micrótomo Leica RM2145 (Leica, Inglaterra). Os cortes foram então montados em lâminas de microscopia e essas foram mantidas em estufa a 37 °C durante um período mínimo de 12 horas para melhor aderência dos cortes.

Em seguida os cortes foram desparafinizados e rehidratados a temperatura ambiente trocando-se a resina paraplástica por xileno, e depois o xileno por concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70%). Uma vez rehidratados, as secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) ou pelo método de Perls (método para detecção de Ferro) para se observar as nanopartículas magnéticas (Villanueva, *et alli*, 2009).

O material foi analisado em microscópio de luz Zeiss Axioskop para avaliar o padrão histológico do tecido e identificar a presença de fungos e das nanopartículas. Micrografias ilustrativas foram obtidas pela captura das imagens utilizando o programa Axio Vison 40v 4.6.1.0 Copyring © 2002-2004.

3.3.5.3. Dosagens de citocinas pela técnica de ELISA

A dosagem das citocinas interferon-gama (IFN- γ), interleucinas- 4 (IL-4), 10 (IL-10) e 12 (IL-12) foram realizadas a fim de verificar a resposta imunológica desenvolvida pelos animais frente ao complexo FM-BlaAmB. Assim, amostras do homogenato de pulmão, obtido conforme descrito no item 3.3.5., foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado para dosagem do total de proteínas e análise das citocinas. A dosagem de proteínas das amostras do pulmão foi realizada pelo método de Bradford, uma vez que a análise de citocinas naquele órgão foi expressa em pg/mg de proteína. Os protocolos experimentais para dosagem das citocinas foram de acordo com os kits de ELISA empregados (e-Bioscience e BD, Estados Unidos). Os experimentos foram realizados em triplicata técnica, com duas repetições biológicas.

3.3.6. Avaliação da toxicidade da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, utilizando-se parâmetros bioquímicos.

A toxicidade do complexo FM-BlaAmB foi avaliada também por meio de ensaios bioquímicos que dosavam os títulos séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, uréia e

transferrina. Para tanto, do sangue coletado de cada animal, separou-se o soro por centrifugação, que foi armazenado a -80 °C até o momento das análises bioquímicas. Essas análises foram executadas no analisador químico automatizado ADVIA 2400 (Siemens), utilizando os reagentes químicos adequados Advia e protocolos estipulados pelo fabricante. A dosagem de AST e ALT foi realizada por métodos cinéticos otimizados; e as dosagens de creatinina, uréia e transferrina foram determinadas por métodos colorimétricos. Todas as dosagens foram realizadas no Sabin laboratório clínico, liberado pela Dra. Monica Lino do Nascimento CRF-DF1811.

3.3.7. Avaliação da genotoxicidade da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico em células de medula óssea

De modo a avaliar se o complexo FM-BlaAmB seria genotóxico, células da medula óssea dos animais foram submetidos à análise de fragmentação do DNA por meio de citometria de fluxo. Para isso as epífises dos fêmures foram seccionadas e com o auxílio de uma seringa contendo 1 mL de soro fetal bovino, em temperatura ambiente, removeu-se a medula óssea. Em seguida esse material foi centrifugado a 229g por três minutos e o sobrenadante removido; o precipitado resultante foi então ressuspensão com álcool 70% gelado, de modo a fixar as células. Após 24 horas esse material foi novamente centrifugado a 229g por três minutos e lavado com PBS; esse processo foi repetido por três vezes. Em seguida, adicionou-se à suspensão celular o tampão de lise (0,1% de citrato de sódio [Invitrogen, EUA], 0,1% Triton X-100 [Merck, Alemanha]) contendo iodeto de propídeo (20 µg/mL de iodeto de propídeo diluído em PBS pH 7,4). Após 30 minutos, sempre ao abrigo da luz, realizou-se a análise da fragmentação do DNA em um citômetro de fluxo (FACS utilizando a porta FL2 – comprimento de onda 560 – 580 nm – fabricante *BD FACSCalibur*TM - USA - Laboratório de Chagas – Universidade de Brasília). Neste ensaio, as células ao serem expostas ao tampão de lise rompem suas membranas expondo o núcleo o que facilita a ligação do iodeto de propídeo ao DNA. Assim as moléculas de DNA íntegras emitem maior fluorescência quando comparadas às moléculas de DNA fragmentado.

3.3.8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPadPrism[®] 5.0. Desse modo, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os grupos experimentais foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância $p < 0,05$. Todos os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média.

4. RESULTADOS

No presente estudo, cujo objetivo principal consistiu na avaliação da eficácia da Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico no tratamento da paracoccidiodomicose, realizaram-se ensaios *in vitro* e *in vivo*, estando os resultados descritos a seguir.

4.2. Ensaios *in vitro*

4.2.1. Concentração mínima da Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico necessária para inibir o crescimento do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

A determinação do MIC foi realizada contando-se as unidades formadoras de colônia, UFC, do fungo *P. brasiliensis* isolado Pb18 quando este foi exposto ao FM-BlaAmB e está expressa na Figura 3. Nessa figura observa-se que a Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-BlaAmB, não perde a atividade fungicida e que o MIC induzido por ela foi igual 0,5 µg/mL, enquanto que o induzido pela Anfotericina B não conjugada, AmB, foi igual a 0,25 µg/mL.

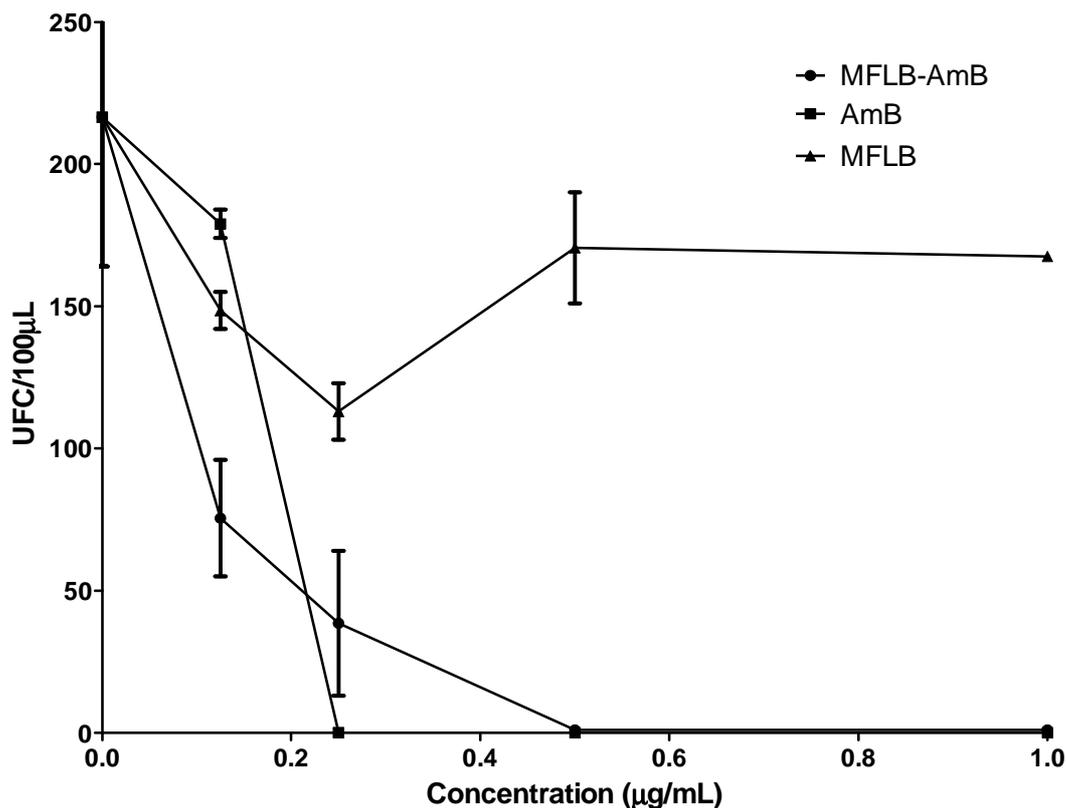


Figura 3. Unidades formadoras de colônia, UFC, do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* isolado Pb18 cultivados por três dias na presença de Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-BlaAmB, ou na presença de Anfotericina B não conjugada, AmB, em diversas concentrações de Anfotericina B. As concentrações de FM-Bla correspondem a quantidade de ferro correspondente contida no complexo FM-BlaAmB. Os experimentos foram realizados em duplicata técnica e biológica.

4.1.2. Toxicidade da Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico sobre células mesangiais e macrófagos peritoneais

Este ensaio foi realizado para verificar se FM-BlaAmB seria capaz de induzir algum efeito na viabilidade de células de mamíferos. Para tal foram utilizadas células renais mesangiais humanas - CM - e macrófagos peritoneais murinos – MØ peritoneais – que após tratamento FM-BlaAmB, AmB e FM-Bla em diversas concentrações e por diferentes tempos foram submetidas ao ensaio de MTT. Os resultados estão expressos na Figura 4.

Como ilustra a Figura 4a, após seis horas na presença de Anfotericina B conjugada (FM-BlaAmB) ou não (AmB) às nanopartículas magnéticas, nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL, a frequência

de CM viáveis incide em torno de 95%. Já a frequência de MØ peritoneais viáveis, após esse mesmo tempo na presença de FM-BlaAmB nessas mesmas concentrações, é igual a 98,1%, 98,2%, 96,4% e 85,3%, respectivamente, Figura 4b. Também após seis horas, mas na presença de AmB, nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL, a frequência de MØ peritoneais viáveis é igual a 98,59%, 100%, 98,67% e 90,41%, respectivamente, Figura 4d. Na presença do FM-Bla, também após esse mesmo tempo de seis horas, tanto a frequência de CM (Figura 4a) quanto de MØ peritoneais (Figura 4b) viáveis é maior do que 94% em todas as concentrações utilizadas.

A Figura 4c ilustra a frequência de CM viáveis após 12 horas de exposição aos diversos tratamentos. Nela vê-se que na presença de FM-BlaAmB nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL, a frequência dessas células viáveis é igual a 94,75%, 94,84%, 91,38% e 90,59%, respectivamente. Ainda na mesma figura pode-se observar que na presença de AmB nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL a frequência de células viáveis é igual 98,06%, 94,33%, 99,45% e 74,48%, respectivamente. Já na presença do FM-Bla nas concentrações 0,42 µg/mL, 0,85 µg/mL, 1,27 µg/mL e 1,70 µg/mL a frequência de CM viáveis é igual a 93,35%, 95,56%, 93,65% e 99,90%, respectivamente.

A frequência de MØ peritoneais viáveis após 12 horas de exposição aos diversos tratamentos está ilustrada na Figura 4d. Como pode ser observado na respectiva figura, após exposição ao FM-BlaAmB a frequência de MØ peritoneais viáveis é igual a 88,43%, 99,53%, 99,70% e 94,09%, nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL, respectivamente. Após exposição a AmB, nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL, a frequência de MØ peritoneais viáveis é igual a 94,86%, 92,99%, 96,60% e 96,44%, respectivamente. A frequência de MØ peritoneais viáveis após a exposição FM-Bla nas concentrações 0,42 µg/mL, 0,85 µg/mL, 1,27 µg/mL e 1,70 µg/mL é igual a 95,51%, 98,34%, 92,90% e 98,22%, respectivamente.

A Figura 4e ilustra a frequência de CM viáveis após 24 horas de exposição dos diversos tratamentos. Após exposição ao FM-BlaAmB nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL, a frequência

de CM viáveis é igual a 83,4%, 88,4%,92,4% e 88,5%, respectivamente. A frequência dessas células após exposição a AmB nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL é igual a 78,7%, 72,4%, 74,5% e 83,3%, respectivamente. Já após 24 horas, de exposição ao FM-Bla nas concentrações nas concentrações 0,42 µg/mL, 0,85 µg/mL, 1,27 µg/mL e 1,70 µg/mL a frequência de células viáveis é 89,6%, 86,3%, 85,5% e 83,9%, respectivamente.

A frequência de MØ peritoneais viáveis após 24 horas de exposição aos diversos tratamentos está ilustrada na Figura 4f. Nela observa-se que a frequência dessas MØ peritoneais após exposição ao FM-BlaAmB nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL é, respectivamente, igual a 98,41%, 92,39%, 97,41% e 97,38%. Já após exposição ao AmB nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL a frequência de MØ peritoneais é respectivamente igual a 93,55%, 95,88%, 94,42% e 94,04%. A frequência de MØ peritoneais viáveis após exposição ao FM-Bla nas concentrações nas concentrações 0,42 µg/mL, 0,85 µg/mL, 1,27 µg/mL e 1,70 µg/mL é igual a 94,12%, 94,40%, 93,25% e 95,61%, respectivamente.

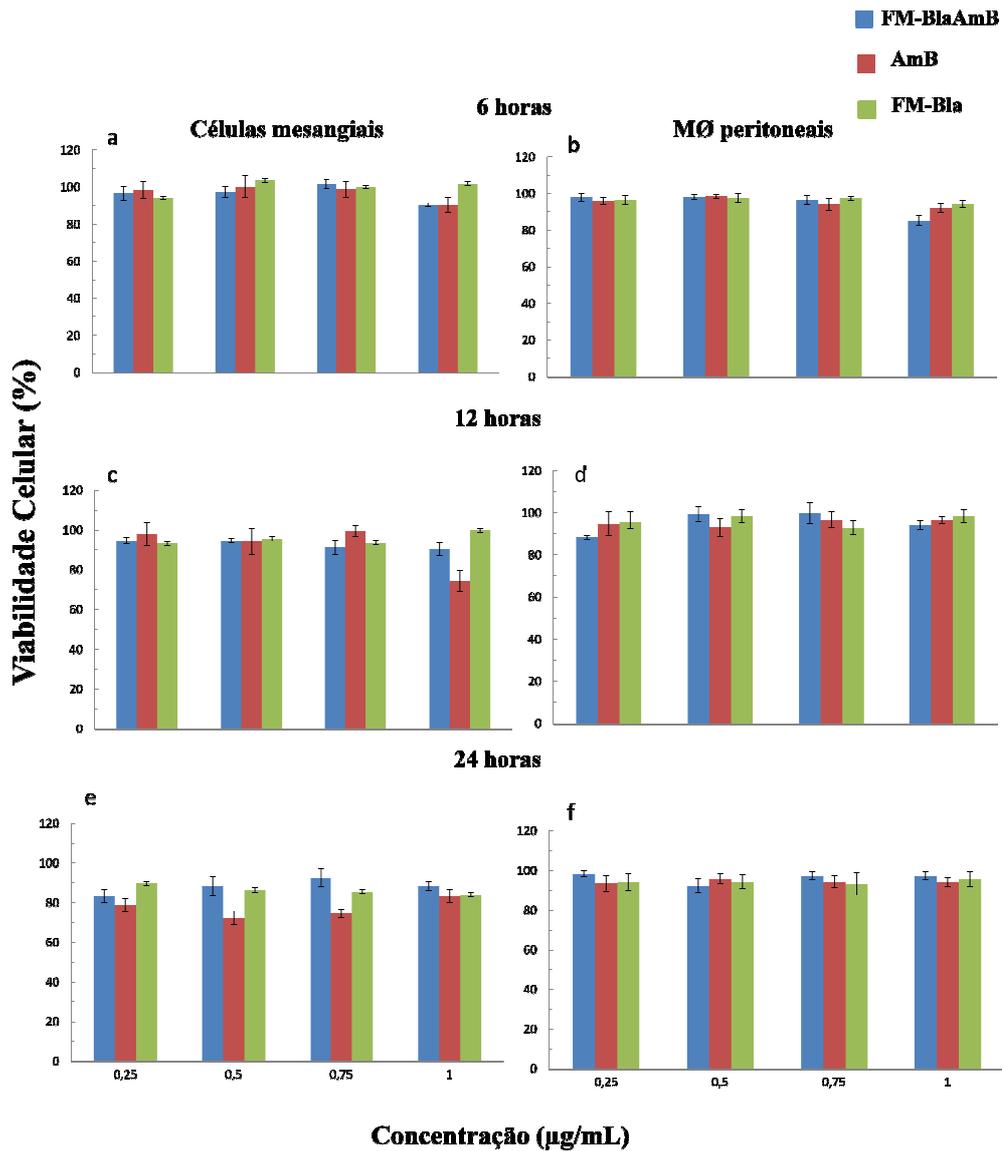


Figura 4. Frequência de células mesangiais humanas e macrófagos peritoneais murinos viáveis após exposição a Anfotericina B conjugada ao fluido magnético de bicamada de ácido láurico, FM-BlaAmB, a Anfotericina B não conjugada, AmB e ao fluido magnético de bicamada de ácido láurico, FM-Bla. (a), (c) e (e) Porcentagem de células mesangiais humanas viáveis após seis, doze e 24 horas de exposição ao FM-BlaAmB e a AmB em diferentes concentrações de Anfotericina B e ao FM-Bla em diferentes concentrações de ferro, respectivamente; (b), (d) e (f) Porcentagem de macrófagos peritoneais murinos viáveis após seis, doze e 24 horas de exposição ao FM-BlaAmB e a AmB em diferentes concentrações de Anfotericina B e ao FM-Bla em diferentes concentrações de ferro, respectivamente. As concentrações de Anfotericina B são: 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL e as concentrações FM-Bla correspondem a quantidade de ferro contida no complexo FM-BlaAmB e são 0,42 µg/mL; 0,85 µg/mL; 1,27 µg/mL e 1,70 µg/mL. $P \leq 0.05$ (one-way ANOVA seguido de Tukey). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e técnica).

4.2. Ensaios *in vivo*

Considerando que os resultados *in vitro* mostraram que o complexo FM-BlaAmB apresenta toxicidade para as células fúngicas e não para as células de mamíferos, decidiu-se verificar se esse mesmo complexo seria eficaz no tratamento da paracoccidiodomicose. Para tanto foram realizados diversos experimentos *in vivo*.

4.2.1. Estabelecimento da Paracoccidiodomicose no modelo experimental murino por via intratraqueal

Uma das abordagens experimentais inicialmente realizadas consistiu no estabelecimento da paracoccidiodomicose em modelos murinos por via intratraqueal. Como ilustra a Figura 5, a via intratraqueal foi apropriada para o estabelecimento da doença. Trinta dias após a inoculação do fungo por essa via, os pulmões dos animais apresentavam granulomas compactos com células fúngicas em seu interior, além de agregados de células polimorfo nucleares e tecido fibroso.

Entretanto, a determinação de UFC não foi possível, pois o número de colônias era muito grande impossibilitando a contagem das mesmas.

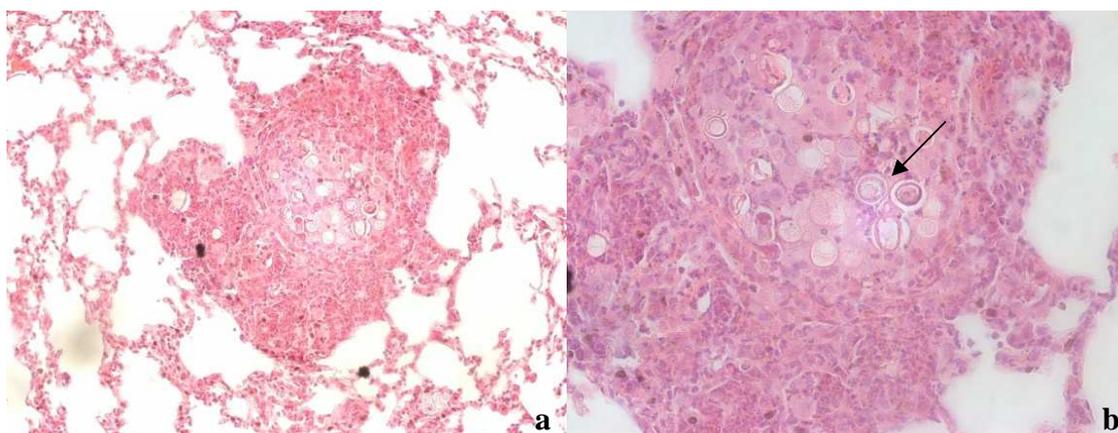


Figura 5. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de pulmão de camundongo BALB/c, corados com hematoxilina e eosina, indicando a presença de granulomas com células de *Paracoccidioides brasiliensis* trinta dias após a inoculação do fungo por via intratraqueal em três animais. Imagens a (20X) e b (40X). A seta indica presença de fungos dentro do granuloma.

4.2.2. Avaliação clínica

A avaliação clínica dos camundongos consistiu em um dos parâmetros utilizados neste estudo para determinar a eficácia da Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico no tratamento da paracoccidiodomicose. Nessa avaliação considerou-se a aparência física dos animais ao longo dos tratamentos e a variação da massa corpórea dos mesmos após os tratamentos. Nenhum animal apresentou alterações na aparência física; neles a pelagem era homogênea, brilhante e sem falhas.

Conforme pode ser observado na Figura 6, os animais infectados com o *P. brasiliensis* e submetidos a um dos tratamentos, PBS, FM-BlaAmB, AmB ou FM-Bla, durante a forma aguda da doença, assim como os não infectados não mostraram variação da massa corpórea depois de 30 ou 60 dias após o início do tratamento.

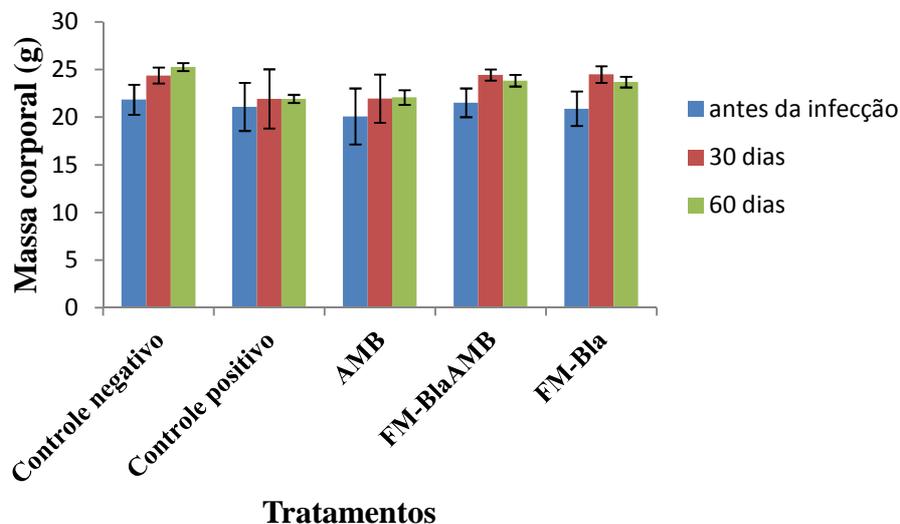


Figura 6. Massas corpóreas dos camundongos (n=10) antes e após trinta e sessenta dias de tratamento da paracoccidiodomicose na forma aguda com Anfotericina B não conjugada, AmB, Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-BlaAmB, ou com as nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-Bla. Controle negativo se refere aos animais não infectados e tratados com PBS. Controle positivo se refere aos animais infectados e tratados com PBS. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os grupos, $p < 0,05$ (one-way ANOVA seguido de Tukey). Os experimentos foram realizados apenas uma vez.

Da mesma forma, os animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com PBS, FM-BlaAmB, AmB ou FM-Bla durante a forma crônica de doença também não mostraram variação da massa corpórea depois de 30 ou 60 dias do início do tratamento. Já os animais que não foram infectados, controle negativo da forma crônica, apresentaram 23% e 30% de aumento da massa corpórea 30 e 60 dias após o início do tratamento, respectivamente, Figura 7.

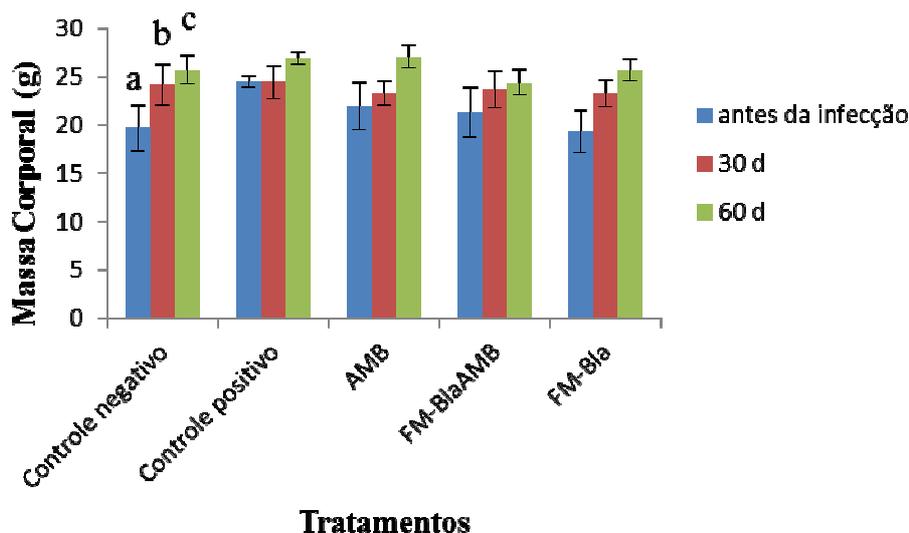


Figura 7. Massas corpóreas dos camundongos (n=10) antes e após trinta e sessenta dias de tratamento da paracoccidioidomicose na forma crônica com Anfotericina B conjugada nanopartículas magnéticas estabilizadas de bicamada de ácido láurico, FM-BlaAmB, Anfotericina B não conjugada, AmB ou com as nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico, FM-Bla. Controle negativo se refere aos animais não infectados e tratados com PBS. Controle positivo se refere aos animais infectados e tratados com PBS. Letras diferentes denotam diferenças significativas, $p < 0,05$ (one-way ANOVA seguido de Tukey).

4.2.3. Determinação da carga fúngica nos pulmões de camundongos com a forma aguda e crônica da paracoccidioidomicose

Para determinar a eficácia da Anfotericina B quando conjugada as nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de ácido láurico no tratamento da paracoccidioidomicose realizaram-se ensaios que permitem, por meio da contagem das UFC, determinar a carga fúngica presente nos pulmões dos animais. Essa contagem foi realizada sete dias após a coleta dos fungos

dos pulmões, que por sua vez foram coletados 30 e 60 dias após o início do tratamento. Os resultados estão mostrados nas figuras 8 e 9.

A Figura 8 ilustra a quantidade de UFC a partir de pulmões recuperados de camundongos que receberam tratamento durante a forma aguda da doença. Nela pode-se observar que todos os tratamentos induziram redução da carga fúngica em 30 e 60 dias após o início do tratamento quando comparado ao grupo controle positivo. Vale ressaltar que o complexo FM-BlaAmB e a AmB reduziram completamente a carga fúngica após 30 dias do início do tratamento.

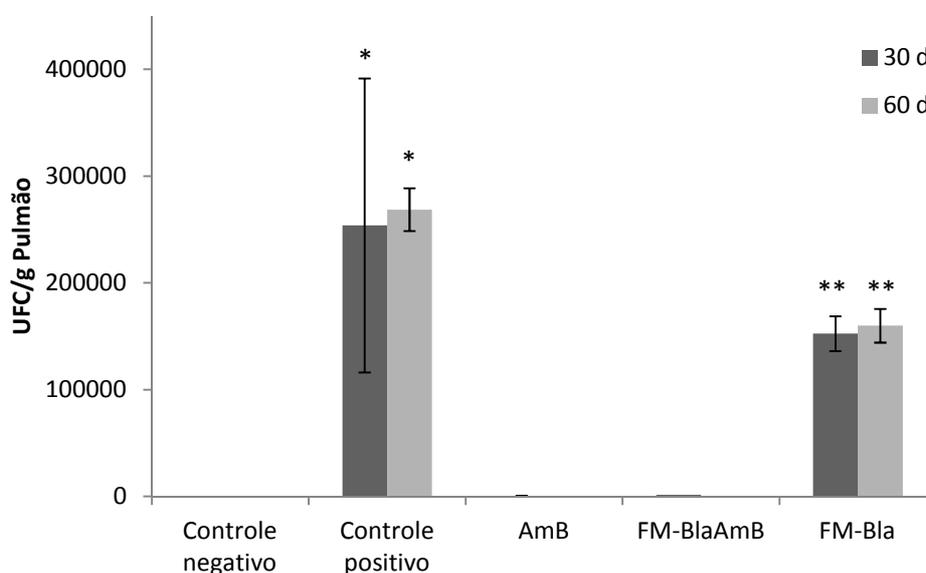


Figura 8. Unidades formadoras de colônias, UFC, recuperadas de pulmão de camundongos infectados pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, e tratados na forma aguda com FM-BlaAmB, AmB ou FM-Bla. A determinação da UFC ocorreu 30 e 60 dias após o início do tratamento e após o cultivo em meio sólido por sete dias a contagem do número de colônias foi realizada (UFC). Controle negativo se refere aos animais não infectados e tratados com PBS. Controle positivo se refere aos animais infectados e tratados com PBS. (*) e (**) denotam diferença significativa entre os tratamentos, $p < 0,05$ (*one-way* ANOVA seguido de Tukey). Eram avaliados cinco animais por grupo.

Entretanto, nos animais que foram tratados durante a forma crônica da doença somente a AmB induziu, 30 e 60 dias após o início do tratamento, redução significativa na carga fúngica nos pulmões, Figura 9.

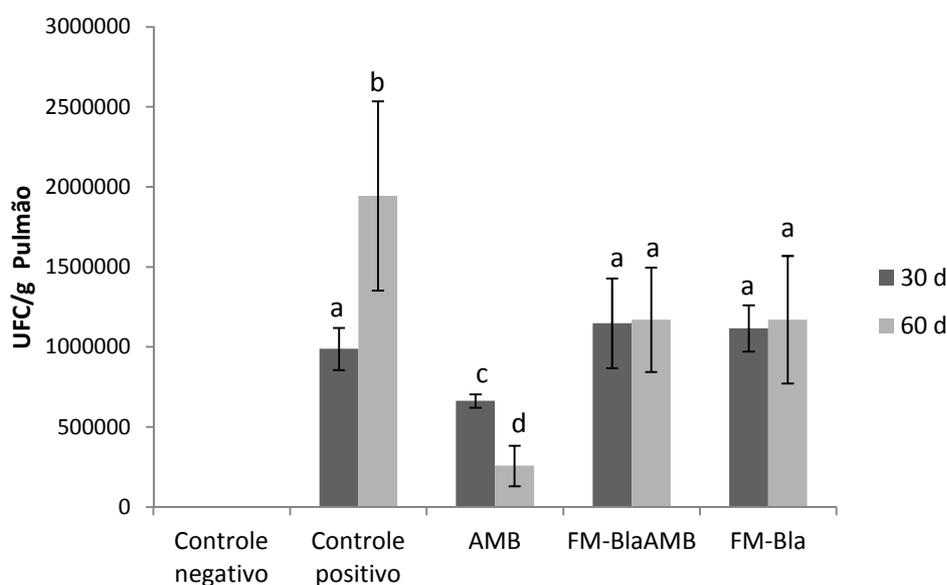


Figura 9. Unidades formadoras de colônias, UFC, recuperadas de pulmão de camundongos infectados pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* isolado Pb18 e tratados na forma crônica com FM-BlaAmB, AmB ou FM-Bla. A determinação da UFC ocorreu 30 e 60 dias após o início do tratamento e após o cultivo em meio sólido por sete dias a contagem do número de colônias foi realizada (UFC). Controle negativo se refere aos animais não infectados e tratados com PBS. Controle positivo se refere aos animais infectados e tratados com PBS. Letras diferentes denotam diferença significativa entre os tratamentos, $p < 0,05$ (*one-way ANOVA* seguido de Tukey). Eram avaliados cinco animais por grupo.

4.2.4. Análise histopatológica dos pulmões dos animais com paracoccidioidomicose

Além da determinação da carga fúngica para confirmar a eficácia da Anfotericina B quando conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico no tratamento da paracoccidioidomicose foram realizadas análises histopatológicas. Por meio deste tipo de análise é possível observar características estruturais dos tecidos e verificar a presença de aglomerados celulares. As fotomicrografias dos cortes histológicos dos pulmões corados com H&E estão representadas nas figuras 10 e 11.

A Figura 10 ilustra cortes histológicos de pulmões provenientes de animais que receberam tratamento durante forma aguda da doença. Ao microscópio de luz, os pulmões dos animais saudáveis, grupo controle negativo,

apresentavam-se com aspecto esponjoso aonde se observa o estroma escassamente desenvolvido e o parênquima constituído por brônquios e bronquíolos de diversos calibres, além de alvéolos, Figura 10a e 11a.

A análise histológica dos pulmões dos animais infectados que receberam PBS e FM-Bla tanto por 30 quanto por 60 dias como tratamentos mostrou a presença de células fúngicas dentro de granulomas desorganizados e de grande infiltrado inflamatório, ao redor de ramos da árvore brônquica e de vasos sanguíneos, Figura 10b e 10c. Já os pulmões dos animais infectados e tratados com a AmB, Figura 10d, ou com o complexo FM-BlaAmB, Figura 10e e 10f, tanto por 30 quanto por 60 dias, não apresentaram granulomas, mas mostravam a presença de infiltrado inflamatório ao redor de vasos, além de espessamento de septos alveolares.

Cortes histológicos de pulmões de animais sadios e infectados e tratados durante a forma crônica da doença estão representados na Figura 11. A análise histológica dos pulmões dos animais infectados que receberam como tratamentos, PBS, FM-Bla, AmB ou FM-BlaAmB, tanto por 30 quanto por 60 dias, mostrou células fúngicas dentro de granulomas, além de infiltrado inflamatório ao redor de regiões da árvore brônquica e de vasos sanguíneos, Figura 11. Entretanto, nos pulmões dos animais tratados com AmB (Figura 11d) e FM-BlaAmB (Figura 11e e 11f), os granulomas eram menores e organizados.

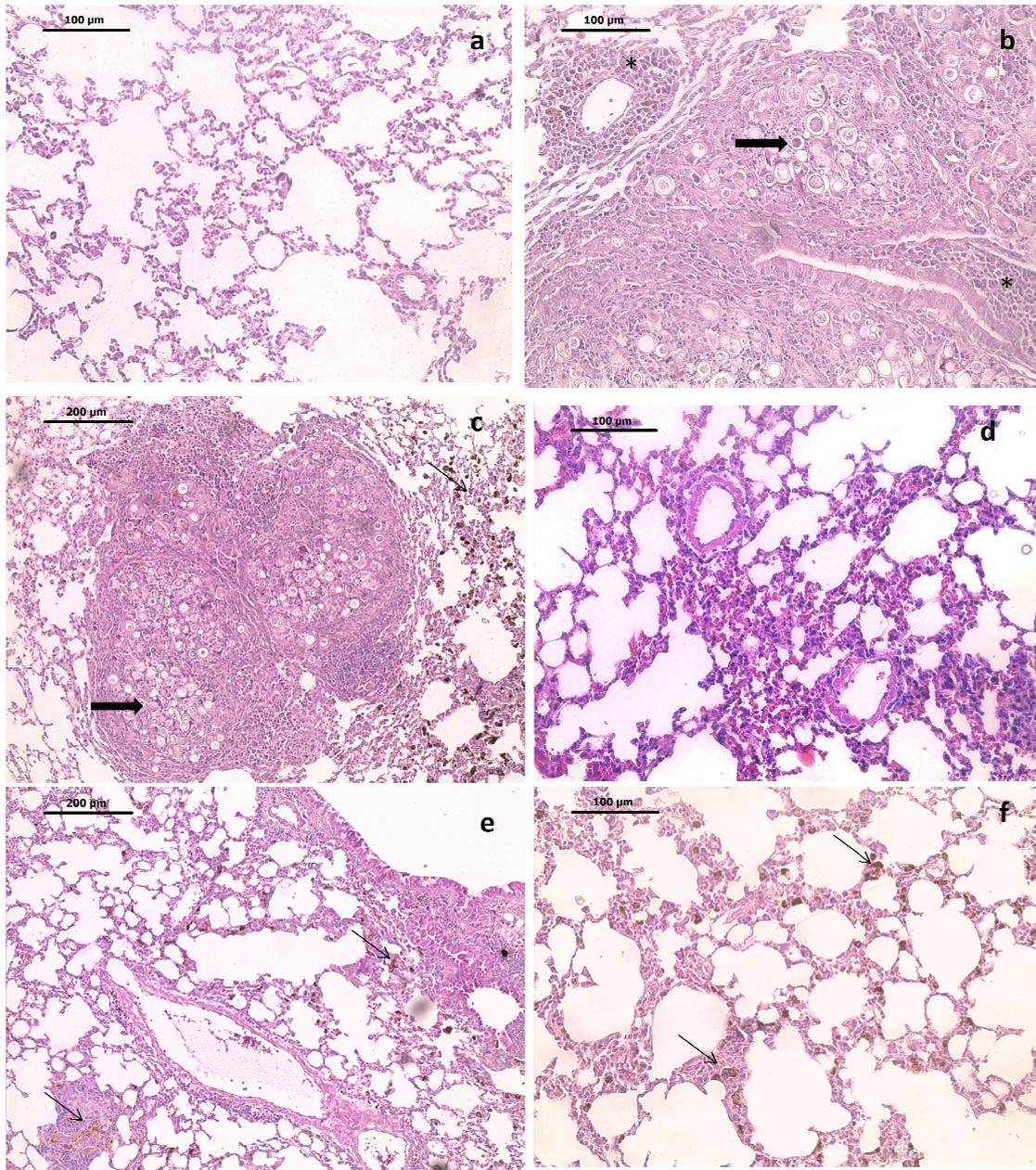


Figura 10. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de pulmões de camundongo BALB/C, corados com H&E. **(a)** animal controle negativo - sadio; **(b)** animal controle positivo – infectado e tratado com PBS **(c)** animal infectado e tratado com FM-Bla (granuloma com presença de células fúngicas, focos inflamatórios e aglomerados de nanopartículas de ferro); **(d)** animal tratado com Anfotericina B - AmB; **(e)** e **(f)** animais tratados com FM-BlaAmB (focos inflamatórios e aglomerados de nanopartículas de ferro). (setas largas – células fúngicas dentro de granulomas; setas finas – aglomerado de nanopartículas; asterisco (*) – focos inflamatórios).

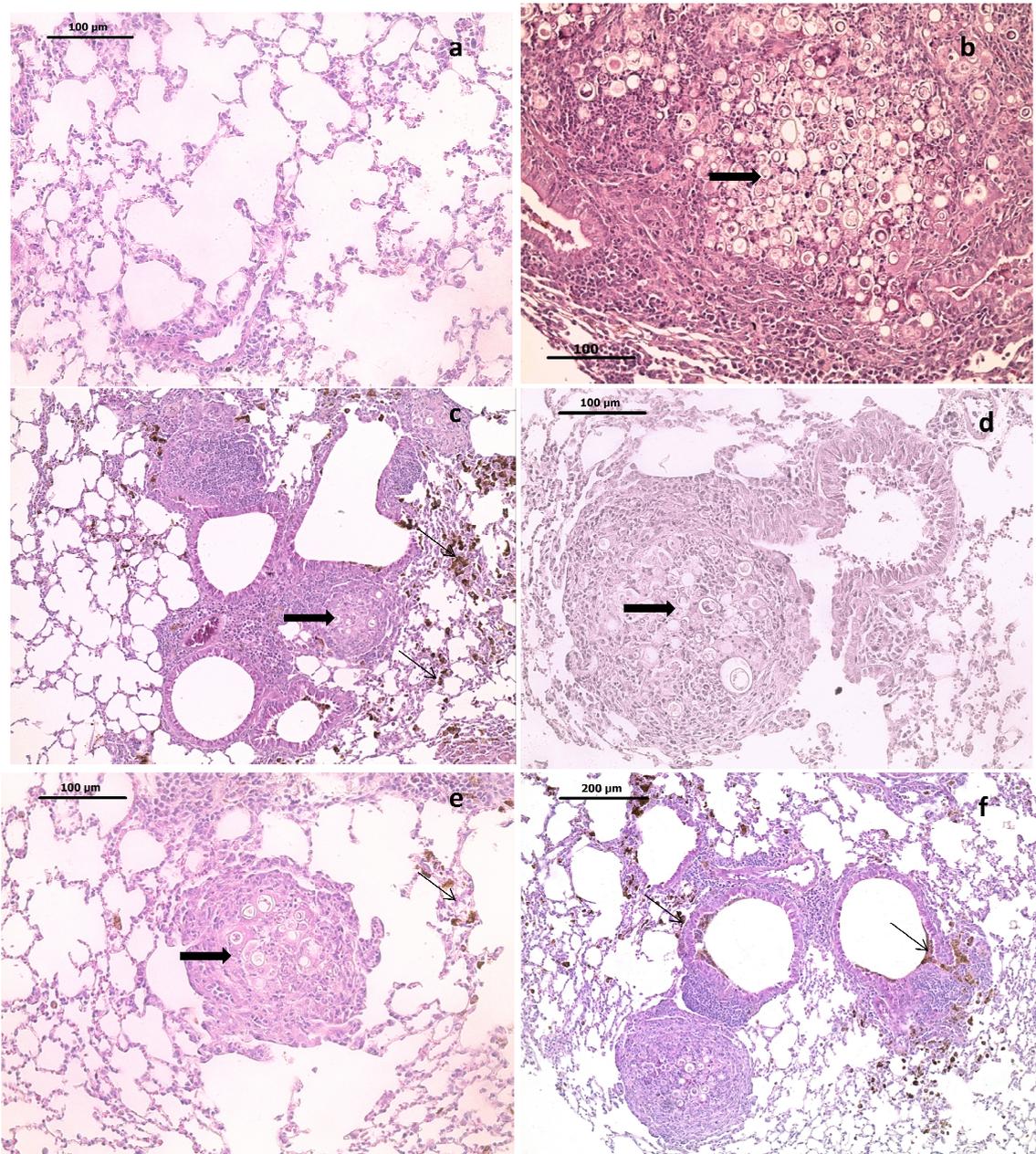


Figura 11. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de pulmões de camundongo BALB/c, corados com H&E. **(a)** animal controle negativo - sadio; **(b)** animal controle positivo – infectado e tratado com PBS **(c)** animal infectado e tratado com FM-Bla (granuloma com presença de células fúngicas, focos inflamatórios e aglomerados de nanopartículas de ferro); **(d)** animal tratado com Anfotericina B - AmB (granuloma com presença de células fúngicas e focos inflamatórios); **(e)** e **(f)** animais tratados com FM-BlaAmB (granuloma com presença de células fúngicas, focos inflamatórios e aglomerados de nanopartículas de ferro). (setas largas – células fúngicas dentro de granulomas; setas finas – aglomerado de nanopartículas; asterisco (*) – focos inflamatórios).

4.2.5. Análise da toxicidade

Para considerar a possibilidade da Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas magnéticas – magnetita (Fe_3O_4) – recobertas com bicamada de ácido láurico em ser utilizadas no tratamento da Pbmicose faz-se necessário avaliar se ela seria nefrotóxica, assim como a Anfotericina B não conjugada, ou ainda se ela induziria toxicidade no fígado ou no baço. Para tal avaliou-se a histopatologia (Figura 12 e 13) e a função desses órgãos medindo-se os níveis séricos de creatinina, ureia, AST, ALT e transferrina (Tabela V).

4.2.5.1. Análise histopatológica do baço, do fígado e dos rins dos animais com paracoccidioidomicose

A análise histológica dos baços, do fígado e dos rins dos animais com paracoccidioidomicose e submetidos ao diferentes tratamentos não mostrou alteração morfológica nesses órgãos na fase aguda e crônica da doença, tanto com 30 e 60 dias de tratamento (Figura 12).

Os rins corados com H&E apresentavam zona cortical e medular de aspecto normal (Figuras 12 'd', 'e' e 'f'). Na região cortical identificavam-se os corpúsculos renais constituídos por capilares e pela cápsula de Bowman. Ainda na cortical distinguiam-se os túbulos contorcidos proximais, com epitélio cúbico simples com borda em escova, e os túbulos contorcidos distais, facilmente caracterizados pela aproximação de seus núcleos celulares e a clareza de seus lumens. Na zona medular visualizava-se as alças de Henle, tubulações revestidas por epitélio variando de cúbico a pavimentoso e os túbulos coletores que apresentavam-se revestidos por uma camada de células cúbicas e com os limites celulares bem evidentes. Na coloração de Perls não foi encontrada a presença de ferro (Figura 13 'd', 'e' e 'f').

Os baços de todos os animais mostravam morfologia normal, com a polpa branca constituída de nódulos linfáticos e a polpa vermelha formada por cordões esplênicos separados por calipares sinusóides revestidos por células endoteliais alongadas (Figuras 12 'a', 'b' e 'c'). Na polpa vermelha, principalmente, encontrava-se ferro como dispersas manchas amorfas de cor azul em todos os grupos estudados (Figura 13 'g', 'h' e 'i' – setas).

Do mesmo modo, os cortes histológicos do fígado de todos os grupos analisados apresentavam parênquima bem preservado com cápsula de tecido conjuntivo íntegra, os lóbulos de tamanho normal delimitados pelos espaços porta. Os hepatócitos apresentavam-se como células poliédricas com citoplasma eosinofílico, alguns binucleares e com aspecto normal, (Figura 12 'g', 'h' e 'i'). Não foi encontrada a presença de ferro nesse órgão (Figura 13 'j', 'l' e 'm').

Os cortes histológicos de pulmões dos animais tratados com FM-Bla e FM-BlaAmB apresentavam grande quantidade de ferro, como ilustrado na Figura 13 'b' e 'c'.

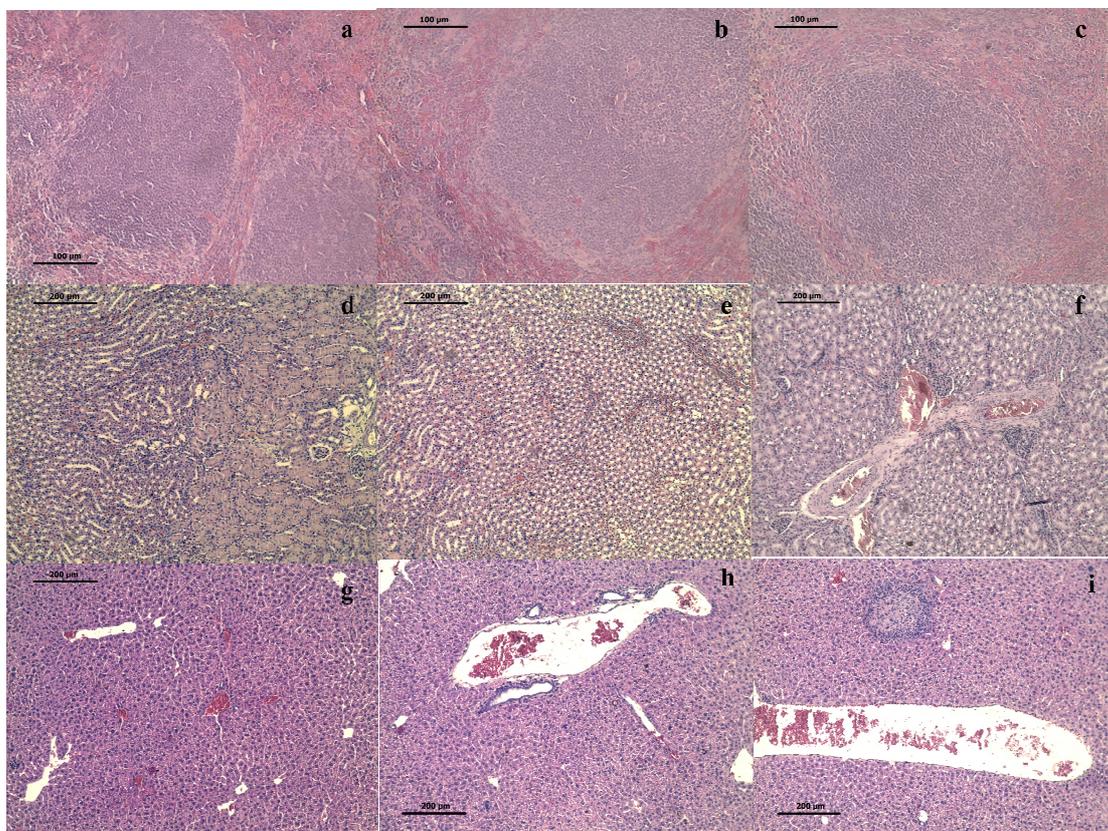


Figura 12. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de fígado, baço e rim de camundongo BALB/c, corados com H&E. **(a)** baço do animal controle negativo; **(b)** e **(c)** baço do animal infectado e tratado com FM-BlaAmB; **(d)** rim do animal controle negativo; **(e)**, rim do animal tratados com AmB; **(f)** Rim do animal tratado com FM-BlaAmB; **(g)** Fígado do animal controle negativo; **(h)** e **(i)** Fígado do animal tratado com FM-BlaAmB .

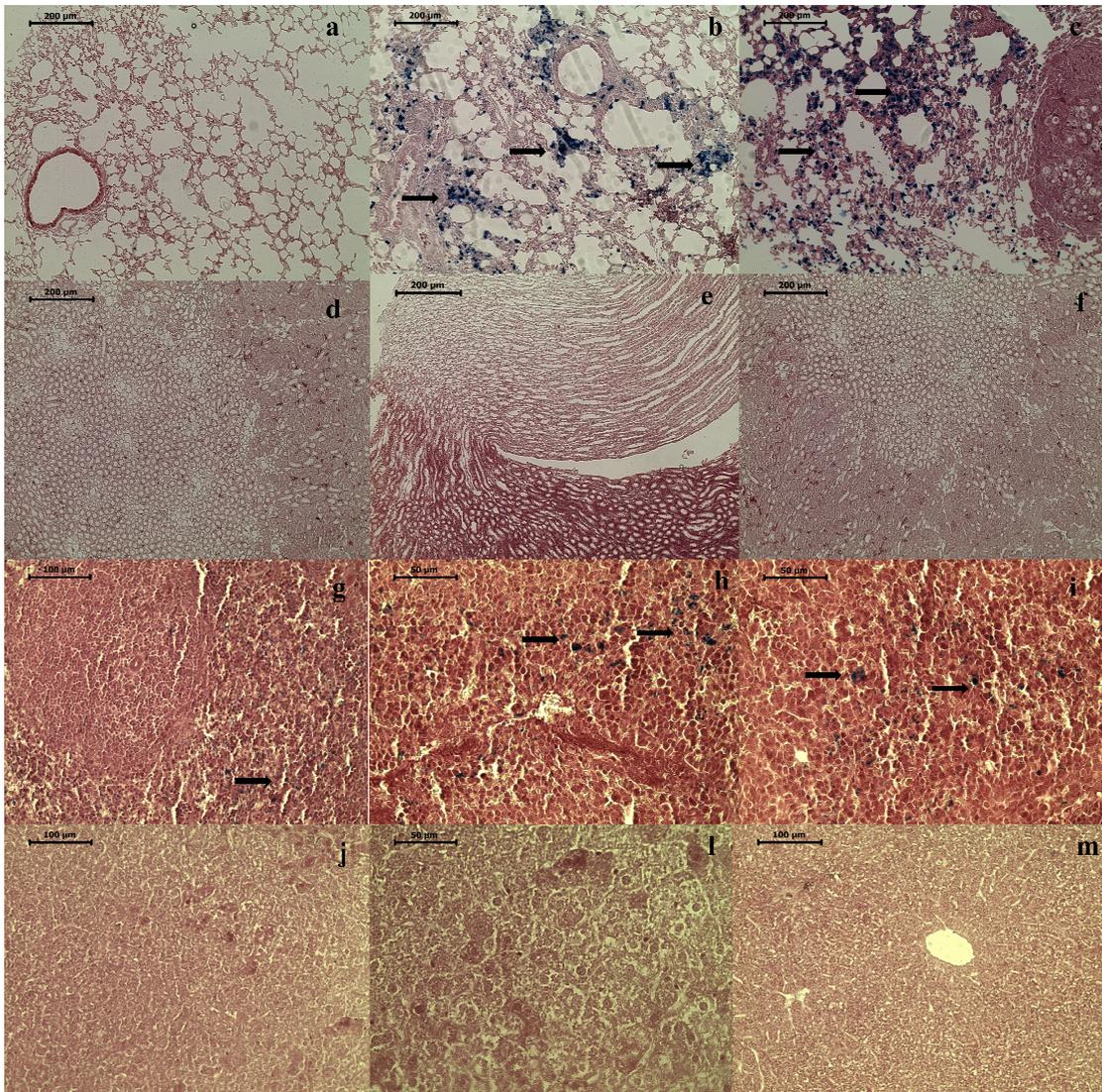


Figura 13. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de pulmões, rim, baço e fígado de camundongo BALB/c, corados com Perls. **(a)** pulmão do animal controle negativo - sadio; **(b) e (c)** pulmão do animal tratado com FM-BlaAmB – presença de ferro (azul); **(d)** rim do animal controle negativo **(e) e (f)** rim do animal tratado com FM-BlaAmB; **(g)** baço do animal controle negativo – presença de ferro; **(h) e (i)** baço do animal tratado com FM-BlaAmB – presença de ferro; **(j)** fígado do animal controle negativo; **(l) e (m)** fígado do animal tratado com FM-BlaAmB. (setas largas – presença de ferro).

4.2.5.2. Avaliação da toxicidade da Anfotericina B conjugada as nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico

A toxicidade do complexo FM-BlaAmB foi avaliada também por meio de ensaios que mediam os títulos séricos de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e transferrina. Os resultados estão expressos na Tabela V.

Nessa tabela pode-se observar que na infecção aguda, após 30 dias do início do tratamento, os níveis séricos de ureia, creatinina e ALT nos animais tratados com PBS, AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla são similares aos detectados nos animais do grupo controle negativo (animais saudáveis). Os níveis séricos de AST mostraram-se menores nos animais tratados com o FM-Bla quando comparado ao grupo controle negativo. Com relação aos níveis séricos de transferrina, somente o tratamento com o complexo FM-BlaAmB induziu aumento dessa proteína quando comparado ao controle negativo.

Ainda nos animais com infecção aguda, após 60 dias do início do tratamento, os níveis de creatinina, ALT e transferrina mostraram-se semelhantes aos níveis detectados no controle negativo. Com relação aos níveis de ureia, o complexo FM-BlaAmB induziu aumento, enquanto o FM-Bla induziu diminuição.

Na infecção crônica, após 30 e 60 dias do início do tratamento, os níveis séricos de creatinina, AST e ALT são semelhantes em todos os grupos. Os níveis séricos de ureia mostraram-se significativamente menores no grupo controle positivo, animais infectado e tratado com PBS, quando comparados a todos os outros grupos; mas após 60 dias os níveis séricos dessas moléculas eram iguais em todos os grupos. Os níveis de transferrina aumentaram 30 e 60 dias após o tratamento com AmB e FM-Bla, respectivamente.

Tabela IV. Níveis de Ureia, Creatinina, AST , ALT e transferrina em camundongos BALB/c após 30 e 60 dias de tratamentos com FM-BlaAmB, AMB e FM-Bla nas infecções aguda e crônica.

GRUPOS	Ureia (mg/DL)		Creatinina (mg/DL)		AST (UI/L)		ALT (UI/L)		Transferrina	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Forma Aguda										
CN	49,25 ±7,45	57,25±6,65 ^{ab}	0,22±0,09	0,22±0,05	101,25±20,28 ^a	83,5±3,31 ^a	7,00±2,16	12,25±1,70	222,50±2,38 ^a	220,5±3,69
CP	48,33±3,51	48,00±5,56 ^a	0,30±0,1	0,23±0,05	127,66±24,84 ^{ab}	71,33±0,57 ^b	10,33±1,15	6,66±2,51	227,00±3,60 ^{ab}	216,66±10,59
AmB	62,80±9,14	61,00±4,00 ^b	0,24±0,08	0,23±0,11	133,2±22,65 ^{ab}	85,00±8,00 ^{ab}	10,20±0,83	10,33±2,51	225,40±12,91 ^{ab}	233,33±5,50
FM-BlaAmB	53,00±8,67	79,00±1,00 ^c	0,27±0,05	0,30±0	97,5±16,34 ^{ab}	113,66±2,30 ^{ab}	9,00±3,16	10,00±0	234,5±4,12 ^b	231,66±0,57
FM-Bla	60,00±5,56	42,66±1,52 ^d	0,30±0	0,30±0	68,66±0,57 ^b	91,00±20,51 ^{ab}	12,00±1,73	9,66±0,57	226,33±5,85 ^{ab}	226,66±10,21
Forma crônica										
CN	66,40±6,26 ^a	58,40±5,07	0,18±0,04	0,1±0	101,25±20,28	83,5±3,31	10,80±2,77	7,2±2,16	212,40±4,72 ^a	210,00±5,61 ^a
CP	47,60±4,82 ^b	53,33±4,93	0,22±0,04	0,20±0,1	127,66±24,84	71,33±0,57	8,2±3,56	4,00±2,64	216,8±14,92 ^{ab}	226,66±11,93 ^{ab}
AmB	58,80±3,56 ^a	64,66±12,22	0,16±0,08	0,13±0,05	133,02±22,65	85,00±8,00	6,6±1,67	5,66±1,15	230,60±5,02 ^b	228,66±9,07 ^{ab}
FM-BlaAmB	65,00±7,78 ^a	60,66±5,03	0,15±0,05	0,2±0,01	97,5±16,34	68,66±0,57	8,5±3,00	5,33±0,57	226,00±9,46 ^{ab}	225,66±11,01 ^{ab}
FM-Bla	57,40±5,54 ^{ab}	55,25±3,77	0,2±0,07	0,1±0	113,66±2,30	91,00±20,51	6,8±2,16	4,25±0,50	225,00±4,18 ^{ab}	227,75±4,99 ^b

Letras diferentes denotam diferença significativa entre os tratamentos, p<0,05

4.2.6. Dosagens das citocinas

De modo a avaliar a resposta imunológica desenvolvida pelos animais frente ao tratamento com Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico realizou-se a dosagem das citocinas IL-10, IL-4, IL-12 e IFN- γ , nos pulmões dos camundongos cujos resultados estão expressos na Figura 14.

Os dados mostram que somente a infecção induziu aumento da produção IL-10; os animais tratados durante a forma aguda da infecção com AmB, FM-BlaAmBMb e FM-Bla, 30 e 60 dias após o início tratamento não mostraram aumento na produção dessa citocina comparado ao aumento já obtido pela infecção. Após 30 dias do início do tratamento, a concentração de IL-10 no pulmão dos animais sadios foi de 12 pg/mg, enquanto que no pulmão dos animais infectados e tratados com PBS a concentração dessa citocina foi de 64 pg/mg, Figura 14a. Após 60 dias de tratamento, a concentração de IL-10 no pulmão dos animais sadios foi de 11 pg/mg, enquanto que no pulmão dos animais tratados com PBS a concentração de IL-10 foi de 218 pg/mg, Figura 14a.

Os animais tratados durante a forma crônica da infecção com AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla, 30 e 60 dias após o início tratamento mostraram aumento na produção da citocina IL-10. Após 30 dias do início do tratamento, a concentração de IL-10 no pulmão dos animais do grupo controle negativo – sadios – foi de 15 pg/mg, entretanto, o menor aumento foi observado quando os animais infectados eram tratados com FM-BlaAmB (89 pg/mg); a concentração dessa citocina nos animais do grupo controle positivo - infectados e tratados com PBS - AmB, e FM-Bla foi respectivamente 212 pg/mg, 122 pg/mg e 174 pg/mg, Figura 15b. Após 60 dias de tratamento a concentração de IL-10 no pulmão dos animais sadios foi de 14 pg/mg, enquanto que no pulmão dos animais infectados e tratados com PBS, AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla a concentração de IL10 foi respectivamente 167 pg/mg, 205 pg/mg, 70 pg/mg e 122 pg/mg, Figura 14b. Portanto, novamente o tratamento com FM-BlaAmB causou aumento significativamente menor nos níveis desta citocina, comparado aos demais tratamentos.

Com relação à produção da citocina IL-4, na Figura 14c pode-se observar que na infecção aguda, após 30 dias de tratamento, a concentração desta citocina nos pulmões dos animais sadios foi de 200 pg/mg e que quando os animais foram tratados com AmB, ocorreu aumento da concentração de IL-4 (767 pg/mg). Já quando os animais foram tratados com PBS – controle positivo – (90 pg/mg), FM-BlaAmB (2 pg/mg) e FM-Bla (130 pg/mg) diminuiu, Figura 14c. Após 60 dias de tratamento com AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla, a concentração de IL-4 detectada nos animais foi, respectivamente, 200 pg/mg, 265 pg/mg e 254 pg/mg, concentrações essas que se mostraram semelhantes à detectada nos animais sadios e tratados com PBS, que foi de 168 pg/mg. Já nos animais infectados e tratados com PBS a concentração de IL-4 aumentou, 439 pg/mg.

A Figura 14d ilustra as concentrações de IL-4 nos animais tratados durante a forma crônica da infecção. Após 30 dias do início do tratamento, a concentração de IL-4 no pulmão dos animais sadios e dos infectados e tratados com PBS, foi respectivamente 263 pg/mg e 315 pg/mg; nos pulmões dos animais infectados e tratados com AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla a concentração de IL-4 foi 176 pg/mg, 130 pg/mg e 252 pg/mg, respectivamente. Vale ressaltar que, estes valores são semelhantes aos encontrados nos animais do grupo controle negativo, animais sadios. Após 60 dias, os animais infectados e tratados com a Anfotericina B no complexo mostraram diminuição da concentração de IL-4 (124 pg/mg), enquanto que nos animais dos grupos controle negativo, positivo e tratados com AmB e FM-Bla, a concentração de IL-4 era respectivamente 363 pg/mg, 292 pg/mg, 237 pg/mg, 180 pg/mg. Vale ressaltar aqui também que, os valores para AmB e FM-Bla diminuíram em relação aos animais sadios.

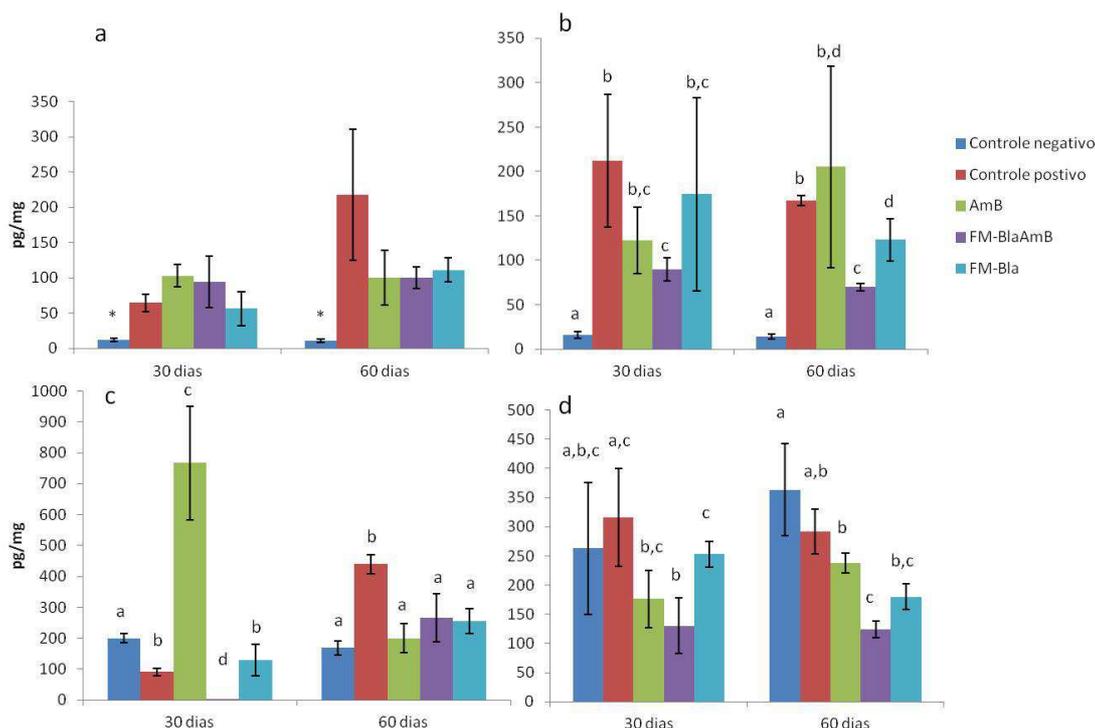


Figura 14. Padrão das citocinas IL-10 e IL-4 secretadas pelo tecido pulmonar de camundongos BALB/c tratados com AMB, FM-BlaAMB e FM-Bla na infecção crônica e aguda por 30 e 60 dias. As dosagens das citocinas IL-4 e IL-10 foram realizadas pelo método de ELISA. a) e b) Produção de IL-10 na infecção aguda e crônica, respectivamente. c) e d) Produção de IL-4 na infecção aguda e crônica, respectivamente. Letras diferentes e (*) nas colunas denotam diferença significativa $p < 0,05$ (*one-way* ANOVA seguido de Tukey). Foram analisados cinco animais por grupo, onde foram realizados duplicatas biológicas e triplicatas técnicas.

A Figura 15a ilustra as concentrações de IL-12 nos animais tratados durante a forma aguda da infecção. Após 30 dias do início do tratamento, a concentração de IL-12 no pulmão dos animais do grupo controle negativo – sadios – (1546 pg/mg) e tratados com AmB (2132 pg/mg) foi semelhante. Nos pulmões dos animais infectados e tratados com PBS, FM-BlaAmB e FM-Bla a concentração de IL-12 diminuiu para 554 pg/mg, 234 pg/mg e 679 pg/mg, respectivamente. Após 60 dias, nos animais infectados e tratados com PBS, a concentração de IL-12 aumentou (2987 pg/mg), enquanto que nos animais infectados e tratados com AmB diminuiu (634 pg/mg), quando comparado aos animais do grupo controle negativo – sadios - cuja concentração foi igual a 1521 pg/mg. Nos animais tratados com FM-BlaAmB (1432 pg/mg) e FM-Bla (1578 pg/mg), a concentração de IL-12 mostrou-se igual à do controle negativo – sadios.

A Figura 15b ilustra as concentrações da IL-12 nos animais tratados durante a infecção crônica. Nela pode-se observar que após 30 dias do início do tratamento somente a infecção induziu aumento na concentração desta interleucina. Após 60 dias, os níveis de IL-12 voltaram ao normal.

Outra citocina quantificada foi o IFN- γ , cujos valores estão expressos na Figura 15c e 15d. Nos animais tratados durante a forma aguda da infecção, após 30 dias do início do tratamento, no grupo AmB a concentração de IFN- γ aumentou (1515 pg/mg), enquanto que nos animais dos outros grupos diminuiu - PBS (214 pg/mg) - FM-BlaAmB (99 pg/mg) e FM-Bla (470 pg/mg) - quando comparado aos animais do grupo controle negativo (sadios) cuja concentração foi igual a 920 pg/mg. Porém, após 60 dias do início do tratamento, a concentração de IFN- γ diminuiu nos animais tratados com AmB (426 pg/mg). Já nos grupos tratados com o complexo FM-BlaAmB (919 pg/mg) e FM-Bla (922 pg/mg), a concentração dessa citocina foi semelhante à do grupo controle negativo (sadios), cuja concentração foi de 921 pg/mg. A concentração desta citocina nos animais do grupo controle positivo - infectados e tratados com PBS - (2315 pg/mg) foi significativamente maior quando comparado a todos os outros grupos, Figura 15c.

Na forma crônica da doença, Figura 15d, após 30 dias do início do tratamento a concentração de IFN- γ nos animais dos grupos controle negativo, positivo e tratados com AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla foi de 619 pg/mg, 1058,90 pg/mg, 513 pg/mg, 505 pg/mg e 493 pg/mg, respectivamente. Portanto, sem diferenças significativas entre os animais sadios e os infectados e tratados diferentemente. Já após 60 dias do início do tratamento, nos animais dos grupos controle negativo, positivo e nos animais tratados com AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla, a concentração de IFN- γ foi 732 pg/mg, 780 pg/mg, 1134 pg/mg, 605 pg/mg e 1152 pg/mg, respectivamente. Apenas o grupo tratado com FM-BlaAmB mostrou redução significativa dessa citocina quando comparado aos animais do grupo controle positivo (tratado com PBS) e tratado com FM-Bla.

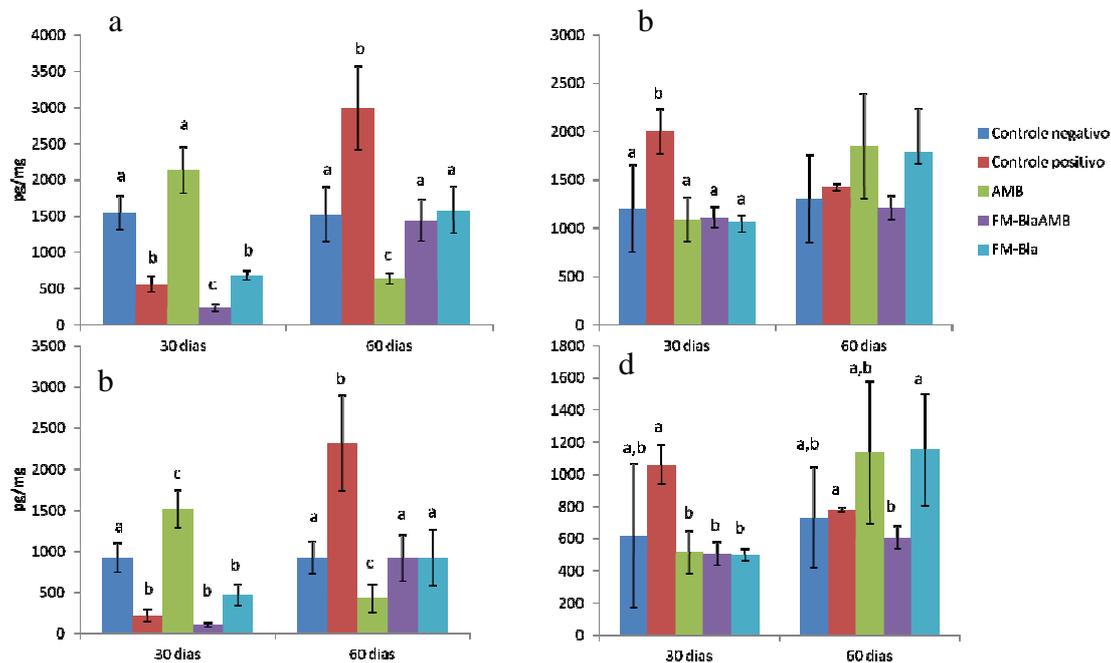


Figura 15. Padrão das citocinas IL-12 e IFN- γ secretadas pelo tecido pulmonar de camundongos BALB/c tratados com AMB, FM-BlaAMB e FM-Bla na infecção crônica e aguda por 30 e 60 dias. As dosagens das citocinas, IFN- γ e IL-12 foram realizadas pelo método de ELISA. (a) e (b) Produção de IL-12 na infecção aguda e crônica, respectivamente. c) e d) Produção de IFN- γ na infecção aguda e crônica, respectivamente. Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa $p < 0,05$ (*one-way* ANOVA seguido de Tukey). Foram analisados cinco animais por grupo, onde foram realizados duplicatas biológicas e triplicatas técnicas.

4.2.7. Genotoxicidade da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico sobre células da medula óssea

Este ensaio foi realizado para verificar se o uso prolongado da Anfotericina B conjugada às nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico induziria lesões no DNA de células de medula óssea. Para isso realizou-se um ensaio de fragmentação de DNA analisado por meio de citometria de fluxo. Os resultados estão mostrados nas figuras 16 e 17.

Conforme pode ser observado na Figura 16, que ilustra os resultados obtidos com os animais tratados durante a forma aguda da doença. Após 30

dias do início dos tratamentos, a frequência de fragmentação do DNA em células de medula óssea dos camundongos saudios foi de 21%, enquanto que nos animais que receberam como tratamento PBS, AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla, a frequência de DNA fragmentado nessas mesmas células foi de 37%, 37% 19% e 36%, respectivamente. Também na Figura 16 pode-se observar que, após 60 dias de tratamento, a frequência de DNA fragmentado nessas células foi de 29%, 47% 44% 36% e 42% nos animais saudios, infectados e tratados com PBS, AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla, respectivamente. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os grupos.

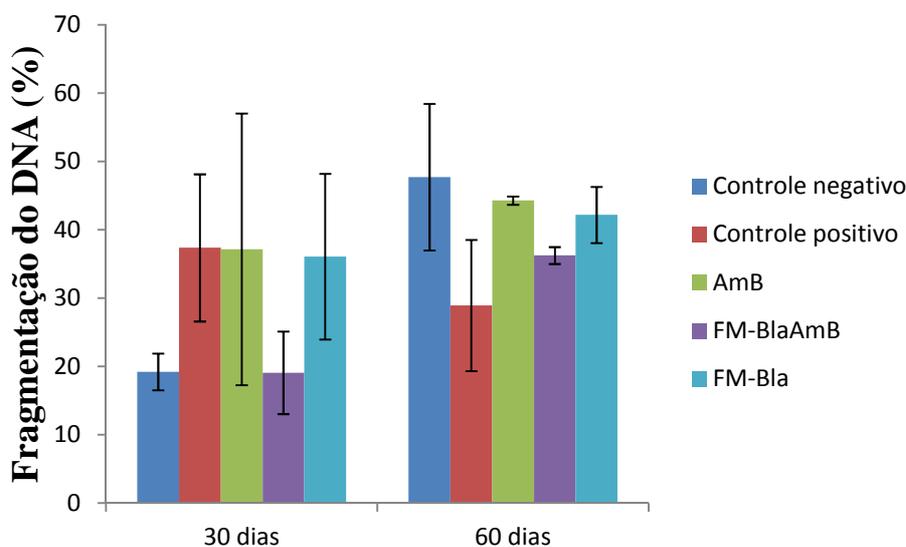


Figura 16. Frequência da fragmentação de DNA, por citometria de fluxo, 30 e 60 dias após o início do tratamento – infecção aguda. Os dados mostram a avaliação do percentual de DNA íntegro nas células da medula óssea nos diferentes tratamentos (FM-BlaAmB, FM-Bla e AmB). $P < 0,05$ (one-way ANOVA seguido de Tukey). Foram analisados cinco animais por grupo.

A Figura 17 ilustra a frequência de DNA fragmentado nas células de medula óssea dos animais que receberam tratamento durante a forma crônica da doença. Nela pode-se observar que, após 30 dias de tratamento, a frequência de DNA fragmentado nas células de medula óssea dos animais saudios, infectados e tratados com PBS, AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla foi respectivamente 8,91%, 8,36% 9,96% e 7,48% e 6,22%. Já após 60 dias de tratamento, a frequência de fragmentação no DNA nas células de medula óssea dos animais saudios, infectados e tratados com PBS, AmB, FM-BlaAmB e FM-Bla foi, respectivamente, 8,32%, 4,95% 6,29% e 5,22% e 6,53%. Assim,

como naqueles com a forma aguda da doença, também não houve correlação estatisticamente significativa entre os grupos.

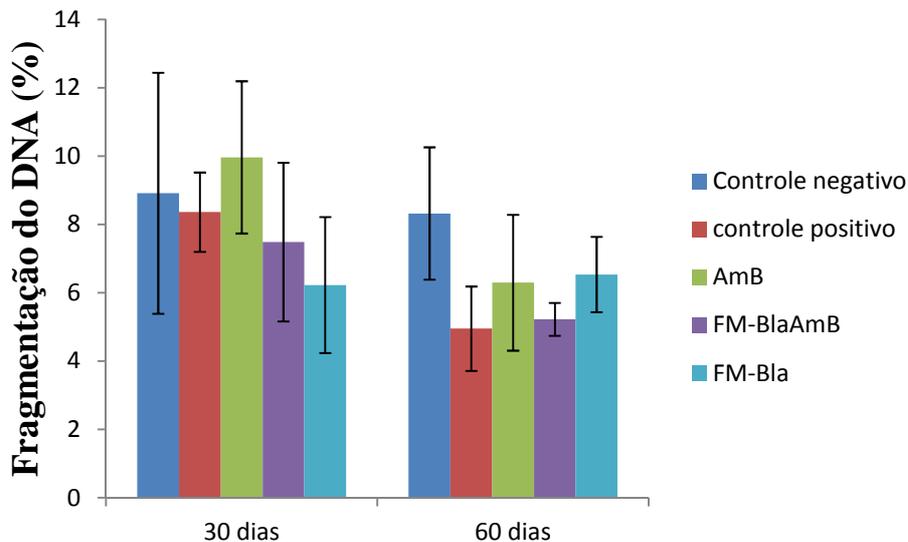


Figura 17. Frequência da fragmentação de DNA, por citometria de fluxo, 30 e 60 dias após o início do tratamento – infecção crônica. Os dados mostram a avaliação do percentual de DNA íntegro nas células da medula óssea nos diferentes tratamentos (FM-BlaAmB, FM-Bla e AmB). $P < 0,05$ (one-way ANOVA seguido de Tukey). Foram analisados cinco animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, o principal desafio no tratamento da Pbmicose consiste na destruição do seu agente etiológico sem que ocorram danos aos sistemas biológicos do hospedeiro, já que a Anfotericina B, um dos principais fármacos utilizado no tratamento dessa micose, induz muitos efeitos adversos, sendo considerado um dos antibióticos mais tóxicos para os humanos. Por isso, novas estratégias que permitam a maximização do seu efeito terapêutico e a minimização dos seus efeitos adversos têm sido desenvolvidas na formulação da Anfotericina B, como, por exemplo, a sua conjugação a um sistema transportador miniaturizado. Vale lembrar que a ligação de um fármaco a um sistema transportador miniaturizado pode modular a sua atividade farmacodinâmica (Lacava *et alli*, 2006). Dentre as nanopartículas que poderiam ser utilizadas como carreador de drogas destacam-se aquelas à base de óxido de ferro devido a sua baixa toxicidade celular, ao seu baixo custo e à facilidade para se conjugar materiais biológicos em sua superfície (Figuerola, 2010).

No tratamento da Pbmicose, por exemplo, nanopartículas magnéticas a base de óxido de ferro poderiam ser utilizadas como carreadoras da Anfotericina B, e assim, controlar a sua liberação nos tecidos alvo por campo magnético ou pela cobertura ter preferência pelo órgão alvo.

Entretanto, vale lembrar que para serem utilizadas na medicina as nanopartículas não devem ser tóxicas ao organismo e para tal devem ser recobertas com uma substância estabilizante. Dentre as diversas nanopartículas magnéticas recobertas com diferentes substâncias estabilizantes estudadas no nosso grupo, as recobertas com o ácido láurico, embora induzam inicialmente uma leve resposta inflamatória, mostraram biocompatíveis, além disso, depositaram-se preferencialmente nos pulmões. Tendo em vista o fato de que o pulmão é o principal órgão infectado pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, desenvolveu-se uma formulação constituída de Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas– magnetita (Fe_3O_4) – recobertas com bicamada de ácido láurico (FM-BIaAmB), de modo que a mesma pudesse ser utilizada no tratamento da Pbmicose. Desse modo, o

presente estudo teve como foco principal a avaliação da eficácia dessa nova formulação de Anfotericina B no tratamento da Pbmicosse em modelo murino.

Para isso, foi preciso primeiramente determinar a concentração mínima de FM-BlaAmB, necessária para inibir o crescimento, MIC, do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. A análise dos resultados (Figura 3) mostrou que a Anfotericina B no complexo FM-BlaAmB não perde a atividade antifúngica, pois apesar de o MIC por ela induzido (0,5 µg/mL) ser maior do que o induzido pela Anfotericina B não conjugada (0,25 µg/mL), ainda assim está dentro da faixa de atividade antifúngica reportada em estudos *in vitro*, cujos valores variam de 0,03 – 1,0 µg/mL (Lacaz *et alli*, 1959; Restrepo, 1985; Hamdan & Resende, 1988). O fato de FM-BlaAmB manter a atividade antifúngica mostra que esse fármaco mesmo no complexo FM-BlaAmB ainda consegue se ligar ao ergosterol das membranas celulares dos fungos. Recentemente, Santos e colaboradores (2011) sugeriram que no complexo FM-BlaAmB as cabeças hidrofílicas da Anfotericina B estão livres, ou seja, disponíveis para interagir com o ergosterol das membranas celulares induzindo nelas a formação de poros e conseqüentemente a morte do fungo .

Entretanto, embora a Anfotericina B tenha afinidade maior pelo ergosterol, ela também se liga ao colesterol encontrado na membrana das células de mamíferos (Bolard *et alli*, 1993; Whyte *et alli*, 1989; Moribe *et alli*, 1999; Huang *et alli*, 2002), explicando assim a sua toxicidade em humanos, particularmente em células renais. Desse modo, sabendo que a Anfotericina B, mesmo no complexo FM-blaAmB, ainda mantém a atividade antifúngica, a etapa seguinte deste estudo consistiu em verificar se, *in vitro* ela induziria algum efeito na viabilidade das células de mamíferos. Para tal, células renais humanas, mais especificamente, células mesangiais e macrófagos peritoneais de camundongos foram cultivados, por 6,12 e 24 horas, na presença de FM-BlaAmB e submetidos ao ensaio de viabilidade celular por MTT.

A análise estatística dos dados desse experimento (Figura 4) revelou que a Anfotericina B no complexo FM-blaAmB não reduziu a viabilidade de células mesangiais humanas nem de macrófagos peritoneais murinos.

Considerando que os resultados *in vitro* mostraram que a Anfotericina B no complexo FM-BlaAmB mantém a atividade antifúngica e não se mostrou tóxica para células de mamíferos, decidiu-se verificar se mesmo no complexo a

Anfotericina B ainda seria eficaz no tratamento da Pbmicosse experimental. Para tanto, foram realizados diversos ensaios *in vivo* utilizando como modelo animal camundongos BALB/c.

Normalmente para estabelecimento da Pbmicosse experimental induz-se a infecção por via endovenosa, mas neste estudo os animais foram infectados por via intratraqueal, pois em humanos a infecção pelo fungo *P. brasiliensis* ocorre por via inalatória. O estabelecimento da doença foi confirmado em um animal que, trinta dias após ser infectado, mostrou uma análise histopatológica dos pulmões com granulomas compactos contendo células fúngicas em seu interior, além de agregados de leucócitos polimorfonucleares e de tecido fibroso. Vale ressaltar que por uma diluição inadequada não foi possível à determinação da quantidade de UFC, uma vez que o número de colônias foi muito grande. As alterações pulmonares resultantes da infecção, descritas neste estudo para esse animal, são similares às observadas por Fernandes e colaboradores (2011), que mostraram o estabelecimento da Pbmicosse em camundongos BALB/c 70 dias após a infecção pelo fungo *P. brasiliensis* também por via intratraqueal.

Uma vez estabelecida a Pbmicosse os animais foram então submetidos ao tratamento. Como neste estudo utilizou-se a Anfotericina B conjugada a nanopartículas de magnetita, ou seja, nanopartículas que contem ferro na sua composição, considerou-se a possibilidade dessas nanopartículas serem fagocitadas por macrófagos. Se isso ocorresse, essas células fagocíticas poderiam servir como reservatório para liberação lenta da Anfotericina B prolongando assim seus efeitos, uma vez que após inalação dos esporos, as leveduras são interiorizadas por macrófagos pulmonares onde sobrevivem e se multiplicam (Moscardi-Bacchi *et alli*, 1990). Por isso, neste estudo administrou-se aos animais FM-BlaAmB ou FM-Bla por meio de instilação nasal, pois ao serem inaladas a Anfotericina B conjugada as nanopartículas chegariam mais rapidamente aos pulmões, onde seria interiorizada por macrófagos alveolares, o que potencializaria a sua atividade frente às leveduras existentes dentro dessa célula (Guo, 2001; Lemke *et alli*, 2005). Além disso, deve-se considerar o fato de que os macrófagos, por fagocitarem material particulado, são reconhecidos como grandes nanocarreadores (Alves-Rosa *et alli*, 2000; Kagan *et alli*, 2005; Moghimi *et alli*, 2005). Da mesma forma, a inalação de

nanopartículas magnéticas conjugadas com fármacos pode melhorar a eficiência terapêutica e minimizar os efeitos colaterais indesejados no tratamento de doenças pulmonares sem afetar a mecânica respiratória (Dames *et alli*,2007).

No decurso do tratamento foi avaliado se a absorção, o transporte e a liberação do complexo MF-BlaAmB ocorriam sem causar toxicidade. Um dos primeiros parâmetros utilizado para determinar a toxicidade do complexo MF-BlaAmB foi a análise clínica dos animais. Para tal, considerou-se a sua aparência física e a variação da massa corporal ao longo do período experimental, pois são critérios adotados para avaliar danos à saúde de animais submetidos a tratamento com medicamentos (OECD, 2002).

Durante o tratamento, tanto na forma aguda quanto na crônica, nenhum animal apresentou alterações na aparência física; neles a pelagem era homogênea, brilhante e sem falhas. Essas observações não corroboram com as de Amaral e colaboradores (2009); esses autores relataram que animais infectados e tratados com PBS e Anfotericina B não conjugada, AmB, apresentavam aparência física alterada caracterizada por piloereção e hipotricose, baixa densidade dos pelos. Vale lembrar que diferentemente deste estudo, em que a infecção ocorreu por via intratraqueal, Amaral e colaboradores infectaram os animais por via endovenosa. Assim é plausível acreditar que a contaminação por via endovenosa muito provavelmente facilita, logo de início, a instalação de uma infecção sistêmica, enquanto que, quando a contaminação ocorre por via intratraqueal, o fungo permanece inicialmente nos pulmões, colonizando os outros órgãos mais tarde, o que explica a aparência física normal nos animais deste estudo.

Com relação às alterações na massa corporal (figura 7 e 6), somente nos animais do grupo controle negativo da forma crônica da doença, aqueles não infectados e tratados com PBS, foi detectado aumento significativo da massa corporal em 30 e 60 dias após o início do tratamento. Esse aumento era esperado, pois os animais tinham 10 semanas de vida quando se iniciou o tratamento, ou seja, estavam em fase de crescimento. Assim, ao final do tratamento com uma solução inócua, eles tinham 14 ou 18 semanas de idade e conseqüentemente com ganho de massa corporal. Os animais dos outros grupos, embora não tenha ganho de massa corporal também não

apresentaram perda. Estes dados diferem dos apresentados por outros. Reuhl e colaboradores (1993), por exemplo, observaram menor perda de massa corporal nos camundongos tratados com Anfotericina B conjugada com éster monometílico comparado com os animais tratados com Anfotericina B (Fungizone). O mesmo foi observado por Amaral e colaboradores (2009), que relataram que animais infectados e tratados com Anfotericina B mostraram perda de massa corporal maior do que os animais infectados e tratados com Anfotericina B conjugada com partículas poliméricas.

Ao fim dos tratamentos, a análise histopatológica e a determinação da carga fúngica dos pulmões dos animais tratados durante a forma aguda da doença mostrou que a Anfotericina B quando conjugada com as nanopartículas apresenta eficácia comparável à da Anfotericina B não conjugada.

Embora a morfologia seja um aspecto fenotípico deveras importante em estudos de toxicidade, uma análise mais detalhada que permita uma detecção precoce dos efeitos de uma substância deve ser considerada; esta detecção precoce envolve a análise de fragmentação do DNA. Assim sendo, neste estudo, realizou-se um ensaio de genotoxicidade em células de medula óssea de modo a verificar se a Anfotericina B conjugada a nanopartículas estabilizadas com bicamada de ácido láurico não induziria danos no material genético. Nesse contexto a medula óssea que é um tecido altamente vascularizado, com uma população de células que se dividem rapidamente, é frequentemente utilizada em testes de avaliação de danos no DNA. Os resultados mostraram que a Anfotericina B, conjugada ou não, não induz fragmentação do DNA. Os resultados deste estudo reforçam os da análise histopatológica que mostraram que esse complexo somente é tóxico para as células do fungo *P. brasilienses*.

Considerando o fato de que a Anfotericina B conjugada foi administrada aos animais a cada três dias, enquanto que a Anfotericina B não conjugada, assim como na clínica, foi administrada aos animais diariamente, estes resultados são interessantes, pois a possibilidade de se administrar a Anfotericina B em concentrações menores, aproximadamente 50% menor, já se mostra benéfica.

Entretanto, a carga fúngica no pulmão dos animais que iniciaram o tratamento na forma crônica da doença não diminui após 30 e 60 dias do

tratamento com FM-BlaAmB. Apesar disso, os granulomas apresentavam-se mais compactos, mais organizados e com menos células fúngicas quando comparado aos animais do grupo controle positivo, ou seja, aqueles infectados e tratados com PBS. Estes últimos apresentaram as células fúngicas dentro de granulomas desorganizados; aos 60 dias, os granulomas eram maiores. Estes resultados mostram que a Anfotericina B no complexo, mesmo não se mostrando eficaz na diminuição da carga fúngica, inibe a proliferação do fungo Pb18, mostrando atividade fungistática. De acordo com Lewis e colaboradores (1998) a Anfotericina B pode ser fungistática ou fungicida, dependendo da concentração. É importante citar que em humanos, apesar de a regressão das alterações clínicas serem observadas entre um e seis meses após o início do tratamento, a erradicação do fungo nos tecidos é demorada. Talvez com tempos maiores de tratamento, uma vez que esse complexo não foi tóxico, os resultados mostrassem eficazes.

Um fator importante a ser considerado é o fato de que neste estudo foram utilizados dois fluidos com propriedades físico-químicas diferentes, um na forma aguda e outro na forma crônica. Na literatura científica tem se demonstrado que a farmacocinética e a captação celular *in vivo* das NPM, incluindo a sua capacidade de interagir com as barreiras biológicas, estão relacionadas com as suas propriedades físico-químicas, incluindo a morfologia, o tamanho, a carga e outras propriedades de superfície. O tamanho das nanopartículas pode influenciar na velocidade e no tempo que elas levam para ultrapassar a barreira endotelial, como também o tempo que levam para ser reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear (Moghimi *et alli*, 2001). De modo geral, nanopartículas de tamanhos reduzidos podem ser interiorizadas mais rapidamente pelas células. Nesse contexto, a diferença no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas dos dois fluidos pode ter contribuído para as diferenças dos resultados obtidos na infecção aguda e na infecção crônica, uma vez que a eliminação do fungo ocorreu nos animais que foram tratados com a amostra que apresentou diâmetro hidrodinâmico médio menor, a amostra B. Apesar de nanopartículas de dezenas de nanômetros poderem ser removidas pelos macrófagos alveolares, as nanopartículas da amostra A, por seu tamanho, talvez tivessem tido dificuldade para se difundir livremente nos tecidos pulmonares.

Outra diferença entre as duas amostras que poderia ser considerada foi o fato de na amostra A, a concentração de Anfotericina B é aproximadamente 28% maior do que na amostra B. Entretanto essas amostras foram diluídas e assim as concentrações administradas aos animais foram equivalentes. Desse modo, com base nos resultados obtidos nos ensaios de histopatologia é plausível acreditar que talvez com tempos maiores de tratamento, uma vez que esse complexo não foi tóxico, os resultados se mostrassem melhores no tratamento da infecção crônica.

Para considerar a possibilidade da Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas magnéticas – magnetita (Fe_3O_4) – recobertas com bicamada de ácido láurico ser utilizada no tratamento da Pbmicose, faz-se necessário avaliar se ela, assim como a Anfotericina B não conjugada, seria nefrotóxica, ou ainda induzisse toxicidade no fígado e baço. Para tal avaliou-se a histopatologia e a função desses órgãos medindo-se os níveis de creatinina, ureia, AST, ALT e transferrina. O complexo também não ocasionou danos no fígado, baço e rins.

As análises morfológicas mostraram que tanto o fígado quanto o baço e os rins dos animais infectados e submetidos a qualquer tratamento não apresentaram nenhuma alteração tecidual.

Os ensaios bioquímicos revelaram que nos animais infectados e tratados durante a infecção aguda, após 30 dias do início do tratamento, os níveis séricos de ureia e de creatinina eram similares aos detectados nos animais não infectados. Embora a literatura cite que um dos sintomas subagudos do tratamento com Anfotericina B é o aumento de creatinina e ureia sérica em decorrência do prejuízo da função renal (Burges & Birchall, 1972; Lemke *et alli*, 2005). Neste estudo, o grupo tratado com AmB, tanto na infecção crônica como aguda, não apresentou alterações significativas nos parâmetros investigados – ureia e creatinina, talvez porque os animais tenham recebido diariamente 0,9 mg/kg de Anfotericina B pura, concentração abaixo do limite tolerável que é de 1mg/kg/dia. O mesmo ocorreu com o grupo tratado com FM-BlaAmB, porém a dose era de aproximadamente 1,37 mg/kg de três em três dias. Considerando que os níveis de uréia e de creatinina são parâmetros importantes para diagnosticar problemas renais, esses resultados são interessantes, pois indicam que o complexo não induz toxicidade renal.

A possibilidade de a Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas de magnetita induzir lesão hepatocelular foi avaliada determinando-se os níveis séricos de AST e ALT, pois estas enzimas são indicadores sensíveis para avaliação de dano hepático em diferentes tipos de doenças. Nos animais infectados e tratados durante a infecção aguda e crônica, após 30 e 60 dias do início do tratamento, os níveis séricos de ALT eram similares aos detectados nos animais não infectados. Já os níveis séricos de AST mostraram-se menores nos animais tratados com o FM-BIa quando comparado aos animais sem a Pbmicoose. Apenas o aumento de AST é um indicativo de lesão hepática, assim é importante citar que tanto a AST quanto a ALT costumam subir e descer mais ou menos na mesma proporção em doenças hepáticas, entretanto a ALT é mais sensível que a AST na detecção de dano hepático, pois está presente, principalmente, em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias do fígado e em pequenas concentrações em outros órgãos (Bruce *et alli*, 1958; Almersjõ *et alli*, 1968; Chalifoux & Lagacê, 1969). Assim sendo, pode-se afirmar que a Anfotericina B quando conjugada a nanopartículas de magnetita não é hepatotóxica.

Por outro lado, de acordo com Laboratório Internacional Charles River (EUA, http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_BALBc_mouse_biochemistry_2008.pdf, acessado em 30/10/2012), os valores de referência para normalidade de AST e ALT (BALB/c) são $183,48 \pm 104,4$ U/l e $72,15 \pm 38,12$ U/l, respectivamente. Comparando com esses valores de referência os dados encontrados para AST estariam normais, porém os dados encontrados para ALT estariam diminuídos em todos os grupos analisados. Devemos considerar, no entanto que, quando se utilizam diferentes métodos para determinação de provas enzimáticas, pode-se resultar em valores muito discrepantes (Fernandes *et alli*, 2001; Almeida *et alli*, 2008). A comparação com outros estudos nas mesmas condições de umidade, temperatura e pH demonstram que as variações entre espécies, linhagens e categoria sanitária determinam valores de referência variáveis (Yoshida *et alli*, 2000; Centro de bioterismo da Universidade de São Paulo, 2000; Sacher *et alli*, 2000). Nesse contexto, as análises devem ser individuais e por linhagem, como foi utilizado neste estudo, visto que cada animal poderá apresentar valores diferenciados de acordo com sua categoria sanitária (Spinelli *et alli*, 2012).

Como citado anteriormente, este é o primeiro estudo que utiliza a Anfotericina B conjugada a nanopartículas de magnetita recobertas com bicamada de ácido láurico no tratamento da Pbmicose experimental, desse modo não é possível comparações diretas entre os resultados deste estudo com relatos da literatura. Mas a literatura tem demonstrado que, em camundongos e primatas não humanos, nanopartículas de magnetita recobertas com citrato na forma de lipossomas (Coelho *et alli*, 2008) ou estabilizadas com DMSA (Monge-Fuentes *et alli*, 2011), respectivamente, não afetam os níveis de AST e ALT.

Além das enzimas anteriormente citadas, neste estudo para avaliação de dano hepático também foram dosados os níveis plasmáticos da proteína transferrina. A transferrina é uma proteína plasmática responsável pelo transporte do ferro do seu sítio de absorção no nível intestinal ou nos sítios de catabolismo da hemoglobina para os precursores de células vermelhas na medula óssea ou para os sítios de estocagem de ferro no sistema reticulo endotelial na medula óssea, no fígado e no baço. Após a liberação do ferro, a transferrina retorna à circulação e é reciclada; sua meia-vida é de oito dias. Além da função de transporte, a transferrina minimiza os níveis de ferro livre no plasma, a perda urinária de ferro e previne os potenciais efeitos tóxicos de níveis elevados de ferro livre circulante. A diminuição dos níveis de transferrina pode ser observada nas doenças hepáticas e em situações clínicas com perdas proteicas, como certas enteropatias, síndrome nefrótica e desnutrição, além de ser um bom marcador de desnutrição em pacientes hospitalizados. Níveis baixos podem ser encontrados em uma variedade de estados inflamatórios agudos e crônicos e na malignidade (Lieu *et alli*, 2001). Os dados apresentados neste trabalho mostram um leve aumento nos níveis de transferrina na infecção crônica com 30 e 60 dias após o tratamento e com 30 dias na infecção aguda. Porém, como não foram encontrados dados de referência para essa proteína, ela pode estar dentro dos limites normais.

No presente estudo também foram dosados os níveis de creatinina e ureia de modo a avaliar se a Anfotericina B, quando conjugada a nanopartículas de magnetita recobertas com bicamada de ácido láurico, alteraria a função renal. A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina no músculo e é geralmente produzida em uma taxa praticamente

constante pelo organismo — taxa diretamente proporcional à massa muscular. Se o organismo mantém sua massa muscular estável, mas apresenta aumento da concentração de creatinina no sangue, é um sinal de insuficiência renal. Os resultados mostraram que não houve aumento da creatinina no sangue, o que era esperado, pois os animais não apresentaram alteração na massa corporal. Outro marcador de lesão renal avaliado neste estudo foi o nível plasmático da ureia, principal produto do catabolismo de proteínas do metabolismo animal. Esse composto é sintetizado primeiramente no fígado e excretada pelos rins, a ureia funciona como um veículo de remoção de amônia tóxica do organismo (Walters *et alli*, 1997, Santin *et alli*, 2006, Thrall, 2007). Assim como a creatinina, os níveis de ureia, no tratamento com FM-BlaAmB e AMB na infecção aguda e crônica, também não alteraram. Esses resultados são indicadores de que a Anfotericina B, quando conjugada a nanopartículas de magnetita recobertas com bicamada de ácido láurico, não induz nefrotoxicidade. O fato de a Anfotericina não conjugada também não se mostrar citotóxica sobre os rins, apesar do seu potencial tóxico já detectado na clínica, pode estar relacionado à via de administração. Ao utilizar a via intraperitoneal deve ser levada em consideração a absorção do fármaco e a biodisponibilidade deste após a absorção. Quando o fármaco é administrado por via endovenosa não passa pelo processo de absorção, ou seja, o fármaco está completamente biodisponível e, conseqüentemente, seus efeitos tóxicos podem ser maiores.

Considerando que a literatura tem demonstrado que o ácido láurico possui a capacidade de estimular o sistema imunológico (Wallace *et alli*, 2001), que o estabelecimento e a disseminação da Pbmicosse dependem da capacidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imune eficaz contra o *P. brasiliensis* e ainda que a sobrevivência desse fungo no hospedeiro depende da sua capacidade em evadir do sistema imune do hospedeiro, fez-se necessário avaliar se a Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de ácido láurico interferiria na resposta imunológica desenvolvida pelos animais frente ao fungo *P. brasiliensis*. Para tal, realizou-se a dosagem das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ nos pulmões dos camundongos infectados, pois, estudos, principalmente em modelos de infecção pulmonar, têm mostrado que a presença de IFN- γ e IL-12 está

associada a formas leves da doença (Souto *et alli*, 2000; Livonesi *et alli*, 2008, Fortes *et alli*, 2011) e a presença das IL-10 e IL-4 está associada a forma grave da doença (Bernard *et alli*, 2005; Karhawi *et alli*, 2000; Pina *et alli*, 2004; Fortes *et alli*, 2011).

A análise dos dados mostrou que os animais infectados e submetidos aos diferentes tratamentos durante a infecção aguda não apresentaram alterações significativas nos níveis de IL-10, tanto após 30 quanto 60 dias do início do tratamento, quando comparado aos animais do grupo controle positivo, ou seja, somente a infecção induziu aumento da produção de IL-10. O aumento dessa interleucina na fase aguda da doença suprime a resposta imune, o que favorece a instalação e a reprodução do fungo. Por isso as análises histopatológicas mostravam a formação de granulomas nos animais sem tratamento. Nesse sentido, a ausência de granulomas nos animais tratados com a Anfotericina B conjugada reforça a eficácia deste fármaco sob esta nova formulação no tratamento da Pbmicose.

Da mesma forma, somente a infecção induziu aumento da produção de IL-4 após 60 dias. Nos animais infectados e submetidos aos diferentes tratamentos os níveis de IL-4 estavam iguais aos detectados nos animais não infectados, controle negativo. A não alteração dos níveis de IL-4 nos animais infectados e tratados mostra que neles não ocorreu a produção de anticorpos contra antígenos do fungo. Esses resultados são interessantes, pois, em humanos, a resposta imune humoral não é protetora contra a Pbmicose, ao contrário, ela representa um comportamento que leva a um mau prognóstico da doença. Mais interessante ainda são os níveis dessas interleucinas na infecção crônica; nos animais infectados e tratados com FM-BlaAmB e AmB os níveis de IL-4 e IL-10 diminuíram quando comparados aos níveis produzidos pelos animais do grupo controle positivo, ou seja, infectados e tratados com PBS.

Os níveis de IL-12 e IFN- γ nos animais tratados por 60 dias durante a forma aguda da doença com FM-BlaAmB e AmB estavam diminuídos quando comparados aos apresentados pelos animais infectados e tratados com PBS. Vale lembrar que durante a evolução da infecção linfócitos CD4⁺ sintetizam IFN- γ e IL-12 o que dificulta a disseminação do fungo. Isso talvez explique o fato de os níveis de IFN- γ e IL-12 estarem diminuídos. Uma vez que nos

animais não foi detectada carga fúngica, já não havia indícios da doença e o sistema imune não precisaria sintetizar essas moléculas.

Na infecção crônica os níveis de IL4 e IL10 nos tratamentos com FM-Bla, FM-BlaAmB e AmB reduziram em comparação com animais infectados e tratados com PBS, sugerindo melhora da resposta imunológica em relação ao hospedeiro, provavelmente por menor carga fúngica encontrada nesses grupos de animais pela presença de granulomas mais compactos e organizados, na histologia dos pulmões, quando comparado com os animais infectados e tratados com PBS.

Tendo-se mostrado neste estudo que a Anfotericina B conjugada a nanopartículas estabilizadas com bicamada de ácido láurico é específica para células fúngicas e eficaz no tratamento da forma aguda da Pbmicose experimental, sem ser hepatotóxica nem nefrotóxica, é plausível acreditar que essa nanoferramenta tem potencial para ser utilizada no tratamento da *Paracoccidioides brasiliensis*. Nesse sentido, deve-se dar continuidade a esta linha de pesquisa de modo a avaliar se com mais tempo de exposição a esse fármaco nanoestruturado, por exemplo, a doença na sua forma crônica seria eliminada.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- (i) a concentração mínima inibitória da Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de ácido láurico contra o fungo *P. brasiliensis* foi de 0,5 µg/mL;
- (ii) a Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico não foi citotóxica para células mesangiais humanas e macrófagos peritoneais de camundongos, *in vitro*;
- (iii) a Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico não induz alterações bioquímicas e clínicas, nem histopatológicas no fígado, nos rins nem no baço de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*, tanto na fase aguda, quanto crônica;
- (iv) a Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico não induz efeitos genotóxicos em células da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*, tanto na fase aguda, quanto crônica;
- (v) a Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico induziu uma resposta imunológica satisfatória na infecção aguda, mas não na infecção crônica.
- (vi) a Anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas de magnetita estabilizadas com bicamada de ácido láurico mostrou eficácia contra a paracoccidiodomicose experimental na infecção aguda, mas não na infecção crônica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADIAN S, BARAR J, SAEI AA, FAKHREE MA, OMIDI Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. **J Vis Exp.** 3(26):1191. 2009
- ALEXANDER BD, WINGARD JR. Study of renal safety in amphotericin B lipid complex-treated patients. **Clin Infect Dis**, 40 Suppl 6: S414-21, 2005.
- ALMEIDA,S.A.; FALEIROS, A.C.G.; TEIXEIRA, D.N.S.; COTA, U.A.; CHICA, J.E.L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos, **J. Bras Patol Med Lab**, 44(6): 429-432, 2008.
- ALMERSJÖ, O.; BENGMARK,S.; L O HAFSTRÖM, L. O.; OLSSON, R. Enzyme and function changes after extensive liver resection in man. **Ann Surg.** 169(1): 111–119, 1969.
- ALVES-ROSA, F.; STANGANELLI, C.; CABRERA, J.; VAN ROOIJEN, N.; PALERMO, M.S.; ISTURIZ, M.A. Treatment with liposome-encapsulated clodronate as a new strategic approach in the management of immune thrombocytopenic purpura in a mouse model, **Blood.** 96 (8) 2834–2840, 2000.
- American Type Culture Collection. MTT Cell Proliferation Assay Instructions. Catalog Number 30-1010K. 2001.
- ANDREOLI TE & MONAHAN M. The interaction of polyene antibiotics with thin lipid membranes. **J. Gen. Physiol** 52(2):300-25, 1968.
- ARRUDA C, VALENTE-FERREIRA RC, PINA A, KASHINO SS, FAZIOLLI RA, VAZ CA, FRANCO MF, KELLER AC E CALICH VL. Dual role of interleukin (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect Immun**, 72(7):3932-40, 2004.
- ATKINSON JA & BENNETT JE. Amphotericin B pharmacokinetics in humans. **Antimicrob Agents Chemother**, 13(2):271-276, 1978.
- BAGINSKI M, STERNAL K, CZUB J, BOROWSKI E. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta Biochim Pol.** 52(3):655-8, 2005.
- BALEY JE, MEYERS C E KLIEGMAN RM. Pharmacokinetic outcome and toxic effects of amphotericin B and 5 fluorocytosine in neonates. **J Pediatr.** 116:791-97, 1990.
- BARBOSA, L. S. Avaliação in vivo da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico. Brasília: Universidade de Brasília, 2004, 64p. Dissertação. (Mestrado em Patologia Molecular).

- BERNARD, G. & FRANCO M. Paracoccidoidomycosis. In: Merz WG, Hay RJ (eds) Medical Mycology, Topley's and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, **10th edition, Hodder Arnold**, London, p.541-559, 2005.
- BEDUNEAU, A.; MA, Z.; GROTEPAS, C.B.; KABANOV, A.; RABINOW, B.E.; GONG, N.; MOSLEY, R.L.; DOU, H.; BOSKA, M.D.; GENDELMAN, H.E. Facilitated monocyte-macrophage uptake and tissue distribution of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles, **PLoS One**. 4(2), e4343, 2009.
- BERNARD, G.; ROMANO, C.C.; CACERE, C.R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI M.J.S.; DUARTE, A.J.S. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidoidomycosis. **Cytokine**. 13, 248-52, 2001.
- BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J. Phys. D** **36**. R198–R206; 2003.
- BICANIC T, WOOD R, MEINTJES G, REBE K, BROUWER A, LOYSE A, BEKKER LG, JAFFAR S E HARRISON T. High-dose amphotericin B with flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial. **Clin Infect Dis**. 47(1):123-30, 2008.
- Bolard, J.; Joly, V.; Yeni, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. Its modulation by delivery systems, **J Liposome Res**. 3(3), 409-427, 1993.
- BOWDEN R, CHANDRASEKAR P, WHITE MH, LI X, PIETRELLI L, GURWITH M, VAN BURIK JA, LAVERDIERE M, SAFRIN S E WINGARD JR. A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients **Clin Infect Dis**., 35(4):359-66, 2002.
- BURGESS, J.L.; BIRCHALL, R. Nephrotoxicity of amphotericin B, with emphasis on changes in tubular function. **Amer J Med** 53: 77, 1972.
- BRAZ, S.V. **Avaliação morfologia de baço, linfonodo e fígado de macaco-prego cebus apella tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA**. Brasília: Universidade de Brasília, 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular).
- BRUCE, R.; TODD, J.K.; LEDUNE, L. *Serum Transaminase: Its Clinical Use in Diagnosis and Prognosis*. **Br Med J**. 2(5105):1125–1128, 1958.
- BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidoidomycosis: an update. **Clin. Microb. Reviews**., v. 6, p.89-117, 1993.
- CALICH VLG, COSTA TA, FELONATO M et al. Innate immunity to Paracoccidoides brasiliensis infection. **Mycopathol**. 165:223-236, 2008.

- CARRILLO-MUÑOZ AJ, GIUSIANO G. EZKURRA PA E QUINDÓS G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter**, 19(2):130-139, 2006.
- CHAVES, S.B.; LACAVAL, L.M.; LACAVAL, Z.G.M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. **IEEE Trans. Mag.**, v.38, p.3231-3233, 2002.
- CHAVES, S.B.; LACAVAL, Z.G.M.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lung induced by DMSA-coated magnetic nanoparticles. **J. Appl. Phy.**,v.97, p.915-917, 2005.
- CHALIFOUX, A.; LAGACÉ, A. Enzymes Sériques pour le Diagnostic de la Nécrose Hépatique Aigüe Expérimentale. **Can J Comp Med.** 33(3): 178–186, 1969.
- COCK, A.M.; CANO, L.E.; VÉLEZ, D.; ARISTIZÁLBAL, B.H.; TRUJILLO, J.; RESTREPO A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.42,p.59-66, 2000.
- COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C., WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública (Rio de Janeiro)**, v.18, p.1441-1454, 2002.
- DAMES, P.; GLEICH, B.; FLEMMER, A.; HAJEK, K.; SEIDL, N.; WIEKHORST, F.; EBERBECK, D.; BITTMANN, I.; BERGEMANN, C.; WEYH, T.; TRAHMS, L.; ROSENECKER, J.; RUDOLPH, C. Targeted delivery of magnetic aerosol droplets to the lung. **Nat Nanotechnol** , 2 : 495–9, 2007.
- DE CAMARGO ZP, DE FRANCO MF. Current knowledge on pathogens and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**; 17(2):41-8, 2000.
- DERAY G. Amphotericin B nephrotoxicity. **J Antimicrob Chemother.** 49 Suppl S1:37-41, 2002.
- ESTEVANATO L, CINTRA D, BALDINI N, PORTILHO F, BARBOSA L, MARTINS O, LACAVAL B, MIRANDA-VILELA AL, TEDESCO AC, BÃO S, MORAIS PC, LACAVAL ZG. Preliminary biocompatibility investigation of magnetic albumin nanosphere designed as a potential versatile drug delivery system. **Int J Nanomedicine.**6:1709-17. 2011.
- FERNANDES, S.T.; TEIXEIRA, E.S.; SANTOS, E.S. Influencia da temperatura e do tempo de armazenamento das dosagens bioquímicas de uréia e creatinina em soro ou plasma caninos. **Arq Bras Med Vet Zootec**, 53(6)1-7, 2001.

- FERNANDES, V.C.; MARTINS, E.M.N.; BOELONI, J.N.; COITINHO, J.B.; SERAKIDES, R.; GOES, A. M. Additive Effect of rPb27 Immunization and Chemotherapy in Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLoS ONE** 6(3): e17885, 2011.
- FIGUEROLA A. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacol. Res.** 62:126, 2010.
- 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, 2011.
- FREITAS, M.L.L.; SILVA, L.P.; AZEVEDO, R.B.; GARCIA, V.A.P.; LACAVA, L. M.; GRISÓLIA, C.K.; LUCCI, C.M.; MORAES, P. C.; DA SILVA, M. F.; BUSKE, N.; CURI, R.; LACAVA, Z.G.M. A double coated magnetite-based magnetic fluid evaluation by cytometry and genetics test. **J. Magn. Magn. Mater.** v. 252: 396-398, 2002.
- FUKUI, H.; KOIKE, T.; SAHEKI, A.; SONOKE, S.; SEKI, J. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS). **Inter. J. Pharm.**, v. 263, p.51-60, 2003
- GARCIA, M.P.; PARCA, R.M.; CHAVES, S.B.; SILVA, L.P.; SANTOS, A.D.; LACAVA, Z.G.M.; Morais, P. C.; Azevedo, R. B. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite- based magnetic fluid stabilized with DMSA. **J. Magn. Magn. Mater.** 293: 277, 2005.
- GARCIA, V.A.P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos.** Brasília: Universidade de Brasília, 2002, 155p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular).
- GHANNOUM, M.A. & RICE, LB.. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microb. Reviews**, v.12, p.501-517, 1999.
- GOMES, G.M.; CISALPINO, P. S.; TABORDA, A. P.; CAMARGO, Z.P. PCR for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microb.**, v.38, p. 3478-3480, 2000.
- GOTZ H. Acrodermatitis chronica atrophicans Hexheimer as an infectious disease. **Hautarzt** 5(11):491-504, 1954.
- GROCOTT, R.G. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. **Amer. J. Clin. Path.**, v. 25, p. 975-979, 1955.
- GROOT OA, TROF RJ, GIBBES AR, SWART NL E BEISHUIZEN A. Acute refractory hyperkalaemia and fatal cardiac arrest related to administration of liposomal amphotericin B. **Neth J Med.** 66(10):433-7, 2008.

- GRUSZECKI WL, GAGOS M, HEREC M E KERNEN P. Organization of amphotericin b in model lipid membranes. A mini review. **Cell. Molec. Biol. Lett.** 8: 161-170, 2003.
- GUO LSS. *Amphotericin B* colloidal dispersion: an improved anti-fungal therapy. **Adv Drug Deliv Ver**, 47:149–63, 2001.
- GUPTA, A.K. & GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v.26, p.3995-4021, 2005.
- HAMDAN, J. S. & RESENDE, M. A. - Lipid composition and effect of amphotericin B on yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, 102:97-105,1988.
- HAHN RC, CONCEIÇÃO YTM, SANTOS NL, FERREIRA JF E HAMDAN JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, 46:324-329; 2003.
- HSUCHEN CC & FEINGOLD DS. Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies on natural membranes. **J Antimicrob Chemother.** 4(3):316-319, 1973.
- Huang, W.; Zhang, Z.; Han, X.; Tang, J.; Wang, J.; Dong, S.; Wang, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol-or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy, **Biophysical Journal.** 83(6),3245-3255, 2002.
- JAIN, T.K.; MORALES, M.A.; SAHOO, S.K.; LESLIE-PELECKY, D.L.; LABHASETWAR, V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. **Mol. Pharm.**, v.2, p.194-205, 2005.
- JAIN KK.. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. **Med Princ**
- KAGAN, V.E.; BAYIR, H.; SHVEDOVA, A.A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin, **Nanomedicine** 1 (4) 313–316, 2005.
- KASHINO SS, FAZIOLI RA, CAFALLI-FAVATI C, MELONI-BRUNERI LH, VAZ CA, BURGER E, SINGER LM, CALICH VL. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J Interferon Cytokine Res.**, 20(1):89-97, 2000.
- Pract.** 17:89-101, 2008.
- KARHAWI, A.S.; COLOMBO, A.L.; SALOMAO, R. Production of IFN gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med Mycol** 38: 225–229, 2000.

- KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? **Int J Antimicrob Agents**, 27 Suppl 1:12-6, 2006.
- KOTLER-BRAJTBURG J, PRICE HD, MEDOFF G, et al. Molecular basis for the selective toxicity of amphotericin B for yeast and filipin for animal cells. **J Antimicrob Chemother**. 5(4):377-382, 1974.
- LACAVA, L.M.; LACAVA, Z.G.M.; AZEVEDO, R.B.; CHAVES, S.B.; GARCIA, V.A.P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; DaSILVA, M.F., MORAIS, P.C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. **J. Magn. Magn. Mater.**, v.252, p.367-369, 2002.
- LACAVA, L.M.; GARCIA, V.A.P.; KÜCKELHAUS, S.A.; AZEVEDO, R.B.; LACAVA, Z.G.M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; GANSAU, C.; BUSKE, N.; MORAIS, P.C. Magnetic resonance and light microscopy of a dextran coated magnetic fluid. **J. Appl. Phys.**, v.93, p.7563-7565, 2003.
- LACAVA, ZULMIRA G. M. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. In: Nelson Duran; Luiz Henrique Capparelli Mattoso; Paulo Cesar de Moraes. (Org.). NANOTECNOLOGIA Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. NANOTECNOLOGIA Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 01ªed.São Paulo: **Artliber Editora**, , p. 175-181, 2006.
- LACAZ, CS. In vitro action of amphotericin B on *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Paul Med* 54:357, 1959.
- LEMKE A, KIDERLEN AF E KAYSER O. Amphotericin B. **Appl Microbiol Biotechnol**, 68:151-162, 2005.
- LEWIS, R. E.; LUND, B. C.; KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; PFALLER, M. A. Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic in vitro mycotic infection model. **Antimicrob Agents Chemother**. 42:1382–1386, 1998.
- LIEU, P.T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P. A.,; YANG, Y. The roles of iron in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, San Diego, v.22, p.1-87, 2001.
- LIVONESI, M.C.; SOUTO, J.T.; CAMPANELLI, A.P.; MAFFEI, C.M; MARTINEZ, R. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. **Med Mycol** 46: 637–646, 2008.
- LÜBBE, A.S.; BERGEMANN, C.; RIESS, H.; SCHRIEVER, F.; REICHARDT, P.; POSSINGER, K.; MATTHIAS, M.; DÖRKEN, B.; HERRMANN, F.; GÜRTLER, R.; HOHENBERGER, P.; HAAS, N.; SOHR, R.; SANDER, B.; LEMKE, A-J.; OHLENDORF, D.; HUHN, W.; HUHN, D. Clinical experiences with magnetic drug

- targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. **Cancer Res.**, v.56, p.4686-4693, 1996.
- MARQUES S. A. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **An. Bras. Dermat.**, v.78, p.135-150, 2003.
- MASSART, R. Magnetic fluids and process for obtaining them. US Patent 4 329 241, 1982.
- MCCARTHY, J.R.; KELLY, K. A.; SUN, E.Y.; WEISSLEDER, R. Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles. **Nanomed.** 2:153–67, 2007.
- MCEWEN JG, BEDOYA V, PATINO MM, SALAZAR ME E RESTREPO A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, 25(3):165-75, 1985.
- MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C ; MURRAY, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects, **FASEB J.** 19 (3) 311–330, 2005.
- MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Long circulating and target specific nanoparticles: theory to practise. **Pharm Rev** 53:283–318, 2001.
- MONGE-FUENTES, V.; PEREIRA, M. P.; TAVARES, M. C. H.; VALOIS, C. R. A.; TEIXEIRA, D. S.; TOMAZ, C; AZEVEDO, R. B. Biodistribution and Biocompatibility of maghemite-based magnetic nanoparticles stabilized with DMSA in non-human primates (*Cebus spp.*). **Fut Med Nanomed.** Submetido, 2009.
- MONGE-FUENTES, V.; GARCIA, M.P.; TAVARES, M.C.; VALOIS, C.R., LIMA, E.C.; TEIXEIRA, D.S.; MORAIS, P.C.; TOMAZ, C.; AZEVEDO, R.B. Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus spp.*). **Nanomedicine (Lond).** Nov;6(9):1529-44, 2011.
- MONTENEGRO M. R. G. Formas clínicas da paracoccidioidomicose. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 28, p.203-204, 1986.
- MORIBE, K.; MARUYAMA, K.; IWATSURU, M. Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposomes, **Int J Pharm.** 193(1),97-106, 1999.
- MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Enhancement of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated monocytes or macrophages. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. p 425, 1990.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** 65 (1–2): 55–63,1983.

- MYKHAYLYK, O.; DUDCHENKO, N.; DUDC, A. Doxorubicin magnetic conjugate targeting upon intravenous injection into mice: High gradient magnetic field inhibits the clearance of nanoparticles from the blood. **J. Magn. Magn. Mater.**, v.293, p.473-482, 2005.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pa.; 1997.
- NG, A. W. K.; WASAN, K. M.;BERESTEIN, G. L. Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v. 6, p.67-83, 2003.
- NIVEN, R.W.; Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol. **Critical Rev Ther. Drug Carrier Sys.** 12:151–231, 1995.
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidance notes for analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies. **ENV/JM/MONO** 19. OECD, Paris, FR, 2002.
- OLIVEIRA SJ, MAMONI RL, MUSATTI CC, et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect.** 4:139-144, 2002.
- OSTROSKY-ZEICHNER L, MARR KA, REX JH E COHEN SH. Amphotericin B: time for a new “gold standard”. **Clin. Infect Dis.** 37(3):415-25, 2003.
- PAMEIRO, M. ;CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura. **Scientia Medica**, Porto Alegre: PUCRS, 15(4): 274-278, 2005.
- PERLS, M. Prussian blue staining for ferric ions detection. **Arch. Pathol.**, v. 39, p. 42, 1867.
- PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.; VAZ, C.A.; KELLER, A.C. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect Immun** 72:2369–2378, 2004.
- RESTREPO AM. The ecology of Paracoccidioides brasiliensis: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, 23:323-334, 1985.
- RESTREPO, A.; McEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: how far from solving the riddle? **Med Mycol.**, v.39, p.233-241, 2001.
- REUHL, K.R.; VAPIWALA, M.; RYZLAK, M.T. Comparative neurotoxicities of amphotericin B and its mono-methyl ester derivative in rats. **Antimicrob Agents Chemother.** 37: 419–28, 1993.

- RICCI, G.; SILVA, I.D.C.G.; MOTA F.T.; WAKAMATSU, A.; FRANCO, M.F. Canine paracoccidioidomycosis: report on the first case of the literature. **ARBS. Ann Rev Bio Sciences**. Special Issue, 2002.
- ROSENSWEIG, R.E. **Ferrohydrodynamics**. New York: Cambridge University Press, 1985. s.p.
- RUIJGROK EJ, FENS MH, BAKKER-WOUDENBERG IA, VAN ETTEN EW, VULTO AG. Nebulized amphotericin B combined with intravenous amphotericin B in rats with severe invasive pulmonary aspergillosis. **Antimicrob Agents Chemother**, 50(5):1852-4, 2006.
- SACHER, R.A.; MCPHERSON, R.A., *Interpretação Clínica dos exames laboratoriais*, 11o.ed. 2000.
- SADEGHIANI, N.; BARBOSA, L.S.; SILVA, L.P.; AZEVEDO, R.B.; MORAIS, P.C.; LACAVA, Z.G.M. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface-coated with polyaspartic acid. **J. Mag. Mag. Mat.**,v.289, P.466-468, 2005.
- SALDANHA, C.A. **Avaliação in vitro da citotoxicidade e genotoxicidade dos polímeros de albumina magnéticos**. Brasília: Universidade de Brasília, 2007, 71p. Dissertação (Mestrado em Biologia animal).
- SANTIN, F.; MOUTINHO, F. Q.; AMARAL, A. S.; TAKAHIRA, R. K. Acompanhamento laboratorial da função renal de cães sadios tratados experimentalmente com doses terapêuticas de anfotericina B. **Cienc. Rural**.36(6): 1816-1823. 2006.
- SANTOS, C. M. B.; S. W. DA SILVA; Guilherme, L.R.; Morais, P.C. SERRS Study of Molecular Arrangement of Amphotericin B Adsorbed onto Iron Oxide Nanoparticles Precoated with a Bilayer of Lauric Acid. **J Phys Chem C** **115**, 20442-20448, 2011.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q., MENDES, R.P.; COLOMBO, A.P.; MORETTI, M.L. Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose, Guidelines in Paracoccidioidomycosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**,v. 39, p.297-310, 2006.
- SILVA, S.M. & TELLES-FILHO, F.Q. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. **Vaccine**, v.13, p.305-311, 2006.
- SILVA, A. S.; BOTTON J.; WOLKMER P.; ZANETTE R. A.; LOPES; SYDNEY HARTZ ALVES, S. T. A.; MONTEIRO, S. G. Suscetibilidade de *Trypanosoma evansi* à anfotericina B. **Cienc. Rural** 39 (9): 2550-2555, 2009

- SINGER-VERMES LM, CIAVAGLIA MC, KASHINO SS, BUERGER E E CALICH VL. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, 30(3):261-4; 1992.
- SOENEN, S.J.H.; BAERT, J.; DE CUYPER, M. Optimal conditions for labelling of 3T3 fibroblasts with magnetoliposomes without affecting cellular viability, **Chembiochem**. 8(17),2067-2077, 2007.
- SOUTO, J.T., FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol** 156: 1811–1820, 2000.
- SOUZA, A. C. O. **Avaliação do tratamento da paracoccidioidomicose experimental utilizando diferentes doses de anfotericina B nanoestruturada em polímeros de ácido poli(lático-co-glicólico)**. Brasília: Universidade de Brasília, 2012, 98p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular).
- SPINELLI, M. O.; CRUZ, R. J.; GODOY, C. M. S.; MOTTA, M. C. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias **SCIENTIA PLENA** (8) 1: 01- 08, 2012.
- SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D.B.; RAOUX, S.; RICE, P.M.; WANG, S.X.; LI, G. Monodisperse MFe_2O_4 (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.126, p.273-279, 2004.
- SUNG, J. .C.; PULLIAM, B. .L; EDWARDS D. A. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. **Trends in Biotechnology** 25(12): 563-570.2007.
- RUSSELL, E. L.; BRIAN, C. L.; MICHAEL, E. K.; ERIKA J. Assessment of Antifungal Activities of Infection Model *albicans* by Using a Dynamic In Vitro Mycotic Alone and in Combination against *Candida* Fluconazole and Amphotericin B Administered. **Antimicrob. Agents Chemother**. 42(6):1382, 1998.
- THRALL, M. A.; **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2007. 582p
- TONG R, TANG L, YIN Q, CHENG J. Drug-polyester conjugated nanoparticles for cancer drug delivery. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**. 2011:8337-8339.2011
- VILLANUEVA A, CAÑETE M, ROCA AG, CALERO M, VEINTEMILLAS-VERDAGUER S, SERNA CJ, MORALES MDEL P, MIRANDA R. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. **Nanotechnology**. 20(11):115103, 2009.
- XIE, J.; HUANG, J.; LI, X.; SUN, S.; CHEN, X. Iron Oxide Nanoparticle Platform for Biomedical Applications. **Curr. Med. Chem.**, 2009, 16(10), 1278-1294, 2009.

- XIE, Y.; LONGEST, P.W.; XU, Y.H.; WANG, J.P.; WIEDMANN, T.S. In vitro and in vivo lung deposition of coated magnetic aerosol particles. **J Pharm Sci** , 99 : 4658–68, 2010.
- VON ZUR MUHLEN, C.; FINK-PETRI , A.; SALAKLANG, J.; PAUL, D.; NEUDORFER, I.; BERTI, V.; MERKLE, A.; PETER, K.; BODE, C.; VON ELVERFELDT, D. Imaging monocytes with iron oxide nanoparticles targeted towards the monocyte integrin MAC-1 (CD11b/CD18) does not result in improved atherosclerotic plaque detection by in vivo MRI, **Contrast Media Mol Imaging**. 5(5), 268-275, 2010.
- YASUDA MA. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. **Expert Opin Pharmacother**, 6(3):385-397; 2005.
- YILMA S, LIU N, SAMOYLOV A, LO T, BRINKER CJ E VODYANOY V. Amphotericin B channels in phospholipid membranes-coated nanoporous silicon surfaces: implications for photovoltaic driving of ions across membranes. **Biosens Bioelectron**, 22(8):1605-11, 2007.
- WALLACE, F.A.; MILES, E. A.; EVANS, C.; STOCK,T. E.; YAQOOB, P.; CALDER, P. C. Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines . **Journal of Leukocyte Biology** V. 69: 449:457, 2001.
- WALSH TJ, TEPLER H, DONOWITZ GR, MAERTENS JA, BADEN LR, DMOSZYNSKA A, CORNELLY OA, BOURQUE MR, LUPINACCI RJ, SABLE CA E DEPAUW BE. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. **N Engl J Med.**, 351(14):1391-402, 2004.
- WATERS, C. B.; ADAMS, L. G.; SCOTT-MONCRIEFF, J. C.; DeNICOLA, D. B.; SNYDER, P. W.; WHITE, M. R.; GASPARINI, M. Effects of glucocorticoid therapy on urine protein-to-creatinine ratios and renal morphology in dogs. **J Veter Inter Med**, v. 11, n. 3, p. 172-177, 1997.
- WILLS, E.A.; REDINBO, M. R.; PERFECT, J. R.; DEL POETA, M. The potential targets for antifungal development. **Emerging Therapeutic Targets**, v. 4, p.1-32, 2000.
- WINGARD, J.; KUBILIS, P.; LEE, L.; YEE, G.; WHITE, M.; WALSH, L. Clinical Significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergilosis. **Clin. Infect Dis.** V 29, p 1402-1407, 1999.
- WHYTE, B.; PETERSON, R.; HARTSEL, S. Amphotericin B and nystatin show different activities on sterol-free vesicles, **Biochem Biophys Res Commun**. 164(2), 609-614, 1989.

YOSHIDA, H.S.; SPINELLI M, O.; GUEDES, R.; CRUZ, R.J.; DAMY, S.B.; TAKANO, J.O.; TOLOSA, E.M.C., Valores hematológicos e bioquímicos em linhagens de camundongos isogênicas

A.Snell, Balb/c, C57Bl/6J e heterogênica suíça, **Rev. Bras. Méd. Vet.** 22(3): 122-124, 2000.

YU, F; ZHANG, L; HUANG, Y; SUN, K; DAVID, AE; YANG, V. The magnetophoretic mobility and superparamagnetism of core-shell iron oxide nanoparticles with dual targeting and imaging functionality. **Biomaterials** 31:5842-5848. 2010.