

RICARDO FONTOURA DE CARVALHO

**ESTUDO *IN VIVO* DA AÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PLGA
CONTENDO ANFOTERICINA B, DMSA E NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS C57BL/6 CAUSADA PELA
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

BRASÍLIA, 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RICARDO FONTOURA DE CARVALHO

ESTUDO *IN VIVO* DA AÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PLGA CONTENDO ANFOTERICINA B, DMSA E NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS C57BL/6 CAUSADA PELA *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Professora Doutora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio
Co-orientadora: Professora Doutora Zulmira Guerrero Marques Lacava

Brasília

2011

RICARDO FONTOURA DE CARVALHO

ESTUDO *IN VIVO* DA AÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PLGA CONTENDO ANFOTERICINA B, DMSA E NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS C57BL/6 CAUSADA PELA *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Aprovada em 31 de agosto de 2011.

Banca Examinadora:

Professora Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Presidente/Orientadora

Faculdade de Medicina/ Universidade de Brasília

Professora Dra. Eloisa Dutra Caldas

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade de Brasília

Professor Dr. José de Souza Soares

Departamento de Pós-Graduação

Centro Universitário Unieuro

Professor Dr. Albino Verçosa de Magalhães

Membro Suplente

Faculdade de Medicina/Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a minha família, por me apoiarem todos os momentos importantes da minha vida e por nunca me deixar desistir.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS pelo meu bem maior: a vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, e minha co-orientadora, Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava, pela oportunidade, aprendizado, compreensão e orientação durante esses anos.

A Iler Ferreira Ribeiro, que me acompanhou em todos os momentos deste trabalho.

Ao Dr. A. Tedesco, do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina do Departamento de Química, FFCLRP, Universidade de São Paulo/SP, pela doação de todo material nanoestruturado.

À Profa Ana Luisa Miranda-Vilela, do Laboratório Nanogem do Instituto de Ciências Biológicas, pelos ensinamentos e realização dos dados estatísticos deste trabalho.

À Profa Selma, Laboratório de Imunologia, pelas explicações e gentileza em realizar as leituras da placas.

Aos técnicos do Laboratório de Dermatocologia, Tércio Rodrigues Pereira e Viviane Medeiros, por todo o apoio e amizade.

À funcionária dona Maria pelo carinho ao ajudar a cuidar dos animais e aos demais funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina.

À técnica Shirley do Laboratório de Imunologia pela colaboração.

Às funcionárias Edigrês e Carla da secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde pelo apoio e presteza.

Aos professores do curso de Ciências da Saúde pelos ensinamentos.

A todos meus colegas do Laboratório de Dermatocologia pelos momentos de interação.

*“Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os outros foram.”*

Grahan Bell, (1847-1922)

LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição mundial da leishmaniose 2009.
- Figura 2:** Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*.
- Figura 3:** Estrutura química da molécula do antimicrobiano anfotericina B.
- Figura 4:** Esquema da estratégia terapêutica usando partículas magnéticas.
- Figura 5:** Camundongo da cepa C57BL/6, espécie *Mus musculus*, fêmea adulta infectada com *Leishmania amazonensis* no coxim plantar direito.
- Figura 6:** Aparelho de magnetohipertemia.
- Figura 7:** Espectrofotômetro (SpectraMax® Plus384 microplate reader).
- Figura 8:** Imagens captadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanoestruturas.
- Figura 9:** Distribuição do diâmetro da pata (mm) de camundongos C57BL/6 infectados por *Leishmania amazonensis*.
- Figura 10:** Distribuição do número de parasitas por pata de camundongos C57BL/6 infectados por *Leishmania amazonensis*.
- Figura 11:** Distribuição do percentual de *Leishmanias* viáveis de camundongos C57BL/6 infectados por *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Características e especificações dos camundongos empregados para o tratamento da Leishmaniose Cutânea..... 36

Tabela 2 - Grupos de tratamento e respectivas doses usadas para o tratamento de camundongos fêmeas da cepa C57BL/6, espécie *Mus musculus*, portadores de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania amazonensis*.....38

Tabela 3 - Esquema diário de dosagem para cada camundongo, de acordo com o grupo de tratamento, correspondente no período de 10 dias.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	demanda bioquímica por oxigênio (do inglês <i>biochemical oxygen demand</i>)
CO ₂	dióxido de carbono
D-anfoB	anfotericina B desoxicolato
D-anfoB-nano DMSA	anfotericina B associada às nanoestruturas PLGA contendo DMSA
D-anfoB-nano-MG	anfotericina B associada às nanoestruturas PLGA contendo DMSA e fluido magnético à base de maghemita
DMC	29,69-diidroxi-49-methoxychalcone
DMF	dimetil-formamida
DMSA	ácido dimercaptosuccínico (do inglês <i>dimercaptosuccinic acid</i>)
DMSO	dimetil-sufóxido
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
Fe ₂ O ₃	Óxido de ferro (III) ou hematita
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
kg	quilograma
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
mg	miligrama
mm	milímetro

Mhz	mega-hertz
mL	mililitro
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolina
nm	nanômetro
NP	nanopartículas magnéticas
Oe	oersted
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pbmicose	paracoccidiodomicose
PBS	solução salina de fosfato (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PLA	poli (D, L ácido láctico)
PLGA	ácido poli-lático-co-glicólico (do inglês <i>polylactic-co-glycolic acid</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Sbv	antimonial pentavalente
SDS	duodecil sulfato de sódio
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
µg	micrograma
µL	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

γ gama

$^{\circ}\text{C}$ graus Celsius

® registrado

US\$ dólar americano

% porcentagem

RESUMO

Os fármacos atuais para o tratamento da leishmaniose ainda não são adequadamente eficazes e nenhuma vacina eficiente está disponível. Assim, o desenvolvimento de terapias alternativas é uma prioridade para o tratamento desta infecção. O objetivo deste estudo foi comparar as atividades leishmanicidas de (1) desoxicolato de anfotericina B (D-anfoB), (2) anfotericina B encapsulada em nanocápsulas de polilático-co-glicólico (PLGA) contendo ácido dimercaptosuccinico (DMSA) (D-anfoB-nano) e (3) D-anfoB-nano, anfotericina B encapsulada em nanocápsulas de PLGA contendo DMSA e fluido magnético à base de maghemita (D-anfoB-nano-MG) no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6. Camundongos fêmeas (N = 6/grupo) foram infectados por via intradérmica na pata direita com promastigotas de *Leishmania amazonensis* na fase metacíclica. Os animais infectados foram divididos em quatro grupos e tratados por via intraperitoneal: (1) PBS 1% por 10 dias consecutivos; (2) D-anfoB, 2mg/kg/dia por 10 dias (totalizando 20mg/kg/animal), (3) D-anfoB-nano e (4) D-anfoB-nano-MG, 6mg/kg nos dias 1, 4 e 7 e de 2mg/kg no dia 10, totalizando 20mg/kg/animal no final do tratamento. O grupo D-anfoB-nano-MG foi submetido a um campo magnético de frequência alternada para realizar a magnetohipertermia. As avaliações da atividade leishmanicida foram realizadas por meio de medições do diâmetro da pata enquanto o número de parasitas e a viabilidade celular foram investigados por meio da diluição limitante e ensaio de MTT. D-anfoB-nano mostrou a mesma eficácia que a D-anfoB na redução do diâmetro da pata e também promoveu maior redução no número de parasitas e de viabilidade celular. Assim, estas nanopartículas mostraram ser mais eficazes do que a terapia com D-anfoB, pois com a mesma dose total, durante 10 dias e com menor frequência de aplicações das doses, apresentaram a mesma eficácia.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*; Anfotericina B desoxicolato; DMSA; PLGA; Nanopartículas; Magnetohipertermia.

ABSTRACT

Current drugs for the treatment of leishmaniasis are far from satisfactory and no effective vaccine is available. Thus, the development of alternative therapies is a priority for treatment of this infection. The aim of this study was to compare the leishmanicidal activities of desoxycholate amphotericin B (D-AMB), AMB nanoencapsulated in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles (Nano-D-AMB) and in D-AMB-coated PLGA–DMSA containing maghemite-based magnetic fluid (Nano-D-AMB-MG) for the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. Female mice (N=6/group) were infected intradermally in the right footpad with promastigotes of *Leishmania amazonensis* in the metacyclic phase. The infected animals were divided into four groups to be treated intraperitoneally: (1) 1% PBS for 10 consecutive days; (2) D-AMB at 2mg/kg/day for 10 days (totalizing 20mg/kg/animal); (3) Nano-D-AMB and (4) Nano-D-AMB-MG at 6mg/kg on the 1, 4 and 7 days and at 2mg/kg on the 10 day, also totalizing 20mg/kg/animal at the end of the treatment. The Nano-D-AMB-MG group was submitted to an AC magnetic field to produce magnetohyperthermia. The evaluations were done through paw diameter measurements while the parasite number and the cell viability were investigated by limiting dilution assay. D-AMB-coated PLGA–DMSA nanoparticles showed the same efficiency as free D-AMB to reduce paw diameter, and Nano-D-AMB treatment also promoted a greater reduction in parasite number and cell viability than free D-AMB. Thus, these nanoparticles appeared more effective than free D-AMB therapy to reduce the dose frequency required to achieve the same therapeutic level, favoring an extended dosing interval.

Keywords: *Leishmania amazonensis*; Desoxycholate amphotericin B; DMSA; PLGA; Nanoparticles; Magnetohyperthermia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1.1 Leishmaniose.....	18
1.1.2 Transmissão	18
1.1.3 Epidemiologia	19
1.1.4 Agentes Etiológicos	20
1.1.5 Ciclo de vida das <i>Leishmanias</i>	21
1.1.6 Formas Clínicas da Leishmaniose.....	23
1.1.7 Tratamento.....	24
1.1.8 Nanotecnologia e Materiais Nanoestruturados	29
1.1.9 Magnetohipertermia	31
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 TIPO DE ESTUDO	34
3.2 CEPAS DE <i>Leishmania</i>	34
3.3 ANIMAIS	34
3.4 AMOSTRAS.....	36
3.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLOGICA DAS NANOESTRUTURAS.....	37
3.6 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS.....	37
3.7 TRATAMENTO COM ANFOTERICINA B	38
3.8 VIA DE ADMINISTRAÇÃO	41
3.9 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS DOSAGENS.....	41
3.9.1 Medição das patas.....	41
3.9.2 Diluição Limitante.....	42

3.9.3 Ação das nanocápsulas de PLGA contendo anfotericina B desoxicolato, DMSA e nanopartículas magnéticas sobre a viabilidade celular das <i>Leishmania</i> nos camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	42
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4 RESULTADOS.....	45
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	45
4.2 MEDIDAS DAS LESÕES CUTÂNEAS (DIÂMETRO DAS PATAS) APÓS 24 HORAS E 10 DIAS DO INÍCIO DO TRATAMENTO.....	45
4.3 RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE PARASITAS NAS PATAS DOS CAMUNDONGOS.....	47
4.4 VIABILIDADE CELULAR	48
5. DISCUSSÃO.....	50
6 CONCLUSÃO	54
7 PERSPECTIVAS.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO A - TESTE DE NORMALIDADE DOS DADOS DAS MEDIDAS DO PAQUÍMETRO.....	68
ANEXO B - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS DAS MEDIDAS DO PAQUÍMETRO	69
ANEXO C– ANÁLISE DO TESTE DE NORMALIDADE DA VIABILIDADE CELULAR	70
ANEXO D – ANÁLISE DESCRITIVA DA VIABILIDADE CELULAR.....	71
ANEXO E- COMPROVANTE DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.....	72

1 INTRODUÇÃO

Várias doenças transmitidas por insetos tropicais são responsáveis por surtos epidêmicos causados por carência de medidas de controle eficazes. Doenças como a dengue, a leishmaniose e a tripanossomíase africana (doença do sono) resultam juntas em mais de 10 milhões de novas infecções a cada ano, entretanto os medicamentos nem sempre estão disponíveis e os esquemas terapêuticos são inadequados(1).

A leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando, principalmente os países mais pobres e os países em desenvolvimento (1, 2). Os programas de controle ainda são precários e a mortalidade e a morbidade por leishmaniose em todo o mundo são comuns (1).

Fatores socioeconômicos, políticos e ambientais têm favorecido o aumento do número de casos e o custo dos fármacos para o tratamento da doença é particularmente alto (1). No entanto, nos últimos 10 anos, as grandes descobertas científicas foram realizadas no diagnóstico, tratamento e prevenção da leishmaniose, e os preços de vários medicamentos essenciais foram reduzidos. Somente na Índia, são gastos US\$ 86 por paciente tratado com sucesso com a miltefosina (usando preços reduzidos por causa do grande número de pacientes), US\$ 467 para o tratamento com a anfotericina B e US\$ 1.613 para o tratamento com AmBisome® (anfotericina B lipossomal) (3). No Afeganistão US\$ 27 (4); Guatemala US\$ 280 (5) e Peru US\$ 300 por dia de tratamento (6).

O sucesso do tratamento depende de muitos aspectos, como resposta imune do hospedeiro, respostas clínicas e a suscetibilidade ao agente da leishmaniose (7). Os tratamentos são avaliados na base da eficácia, tolerância e viabilidade da administração, além dos custos do tratamento. Existe uma variação regional na resposta aos fármacos leishmanicidas e a recomendação para o tratamento da leishmaniose varia em diferentes regiões (7).

No entanto, os medicamentos disponíveis com ação leishmanicida são limitados e insatisfatórios, pois esses compostos são altamente tóxicos, poucos tolerados e com efetividade variável (7).

As constantes falhas no tratamento também justificam um maior número de contribuições focando novos alvos moleculares potenciais. Essas falhas na terapia

são agravadas quando decorrentes de co-infecção com vírus HIV ou outras deficiências de natureza imunológica, fisiológica ou farmacológica (8).

O progressivo aumento de resistência dos parasitas às drogas específicas preconizadas, como os antimoniais pentavalentes ou os de segunda geração, como a pentamidina e a anfotericina B, justifica a demanda por novos fármacos leishmanicidas (9, 10). Esta é geralmente prejudicada pela localização intracelular dos parasitas que tem sido usada como uma das razões para introduzir os medicamentos dentro da célula parasitada aumentando assim a bioviabilidade e diminuindo os efeitos adversos freqüentes dos fármacos, tais como: febre, calafrios, náuseas, vômitos, cefaléia, e disfunção renal associada com anemia, hipocalcemia e hipomagnesemia (11, 12).

O desenvolvimento de terapias alternativas é uma prioridade no combate à infecção pela *Leishmania* devido aos elevados custos dos tratamentos que, muitas vezes, são mal tolerados pelos pacientes (13). Diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para obtenção de novas formulações farmacêuticas visando a liberação controlada de fármacos capazes de manter ou ampliar a ação de agentes promissores utilizados no combate e controle de doenças (14, 15).

Nesse contexto, técnicas inovadoras vêm demonstrando o grande potencial da nanotecnologia farmacêutica no tratamento, prevenção e diagnóstico de inúmeras patologias, dentre elas as parasitárias (16, 17).

Uma das tecnologias que tem sido testada atualmente emprega nanopartículas, que têm obtido sucesso para a entrega sítio-específica de antibióticos, anticancerígenos, antiepilépticos, anti-hipertensivos, imunossupressores ou mesmo como co-adjuvantes de vacinas (18). Muitos fármacos antineoplásicos têm sido testados com sucesso em formulações de nanopartículas (19). Acredita-se que os fármacos nanoestruturados sejam mais eficazes que as terapias tradicionais por eliminar diretamente microrganismos patogênicos sem desencadear a liberação de mediadores químicos (19).

Outra grande vantagem das nanopartículas para liberação controlada de fármacos reside no fato de que o fármaco preserva sua atividade farmacológica, pois a parte ativa da molécula não é alterada quimicamente pelo polímero. O novo veículo permite também a diminuição da toxicidade e resistência relatadas com o uso de drogas de primeira e segunda escolha (17, 18).

Baseando-se nesses fatos, observa-se que os medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, assim como para outras parasitoses tropicais, carecem de formulações mais eficazes (20).

Desse modo, o propósito deste trabalho foi realizar avaliações preliminares da eficácia de formulação nanoestruturada de anfotericina B e da terapia por magnetohipertermia no tratamento da leishmaniose cutânea (LC) causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos infectados.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Leishmaniose

Os parasitas do gênero *Leishmania* causam a doença conhecida como leishmaniose, que se manifesta através de um grande espectro de formas clínicas como simples lesões cutâneas até infecções sistêmicas que podem ser fatais se não tratadas (21).

As leishmanioses constituem um conjunto complexo de doenças que apresentam características e peculiaridades diferentes decorrentes da multiplicidade de seus agentes etiológicos, vetores, reservatórios e fatores ambientais (22).

1.1.2 Transmissão

Apesar de ser considerada uma doença endêmica, de alta morbidade e de baixa mortalidade, a LC é considerada uma doença zoonótica, infecciosa, não contagiosa, agravada por diversos fatores (23). A LC é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos por flebotomíneos (24, 25, 26). É uma das principais doenças transmitidas por vetores e que apresenta grande distribuição territorial (24, 25, 27).

1.1.3 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 1 bilhão de pessoas estão infectadas com algum tipo de doença tropical negligenciada e outros 2 bilhões vivem em áreas de risco nos países tropicais e subtropicais (2). Estima-se que todos os países de baixa-renda são afetados simultaneamente com mais de 5 doenças negligenciadas (2).

A prevalência mundial da leishmaniose está estimada em 12-15 milhões de indivíduos infectados, com, aproximadamente, 2,3 milhões de novos casos por ano em todo o mundo (21); acredita-se que a mortalidade anual seja de 60 mil, sendo que 350 milhões de pessoas vivem em regiões de risco, conforme Figura 1 (2, 28).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, em 2009, existiam cerca de 11,4 infectados para cada grupo de 100.000 habitantes, enquanto que no Distrito Federal, a proporção é 1 caso para cada 100.000 habitantes (25).

A leishmaniose é prevalente nos 4 continentes e está distribuído em 22 países no Novo Mundo e em 66 nações do Velho Mundo (42). Encontra-se amplamente distribuída no continente americano, se estendendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, está presente em todos os estados, mas apresenta distribuições regionais diferentes, vetores e espécies de *Leishmanias* distintos, além dos diversos determinantes ambientais, sócio-econômicos e políticos (27).

São conhecidos três padrões epidemiológicos desta endemia: um padrão silvestre, onde ela é vinculada a uma zoonose de animais silvestres; um segundo padrão relacionado aos riscos ocupacionais ou lazer, associados à exposição nas matas e florestas para fins econômicos ou turísticos; e um terceiro padrão, rural e periurbano em áreas de colonização antigas relacionadas às migrações recentes e locais de residência em áreas próximas a matas secundárias residuais (27).

No Brasil, a doença tem sido notificada em todos os estados, com aumento expressivo do número de casos nas últimas décadas, constituindo uma afecção que merece preocupação, tanto pelo risco da ocorrência das deformidades que podem produzir no homem, como pelo envolvimento psicológico do doente. Tem reflexos no campo social e econômico, já que, na maioria dos casos, pode ser uma doença

ocupacional, atingindo o indivíduo em idade de maior atividade laborativa (20, 24, 30, 31, 32).

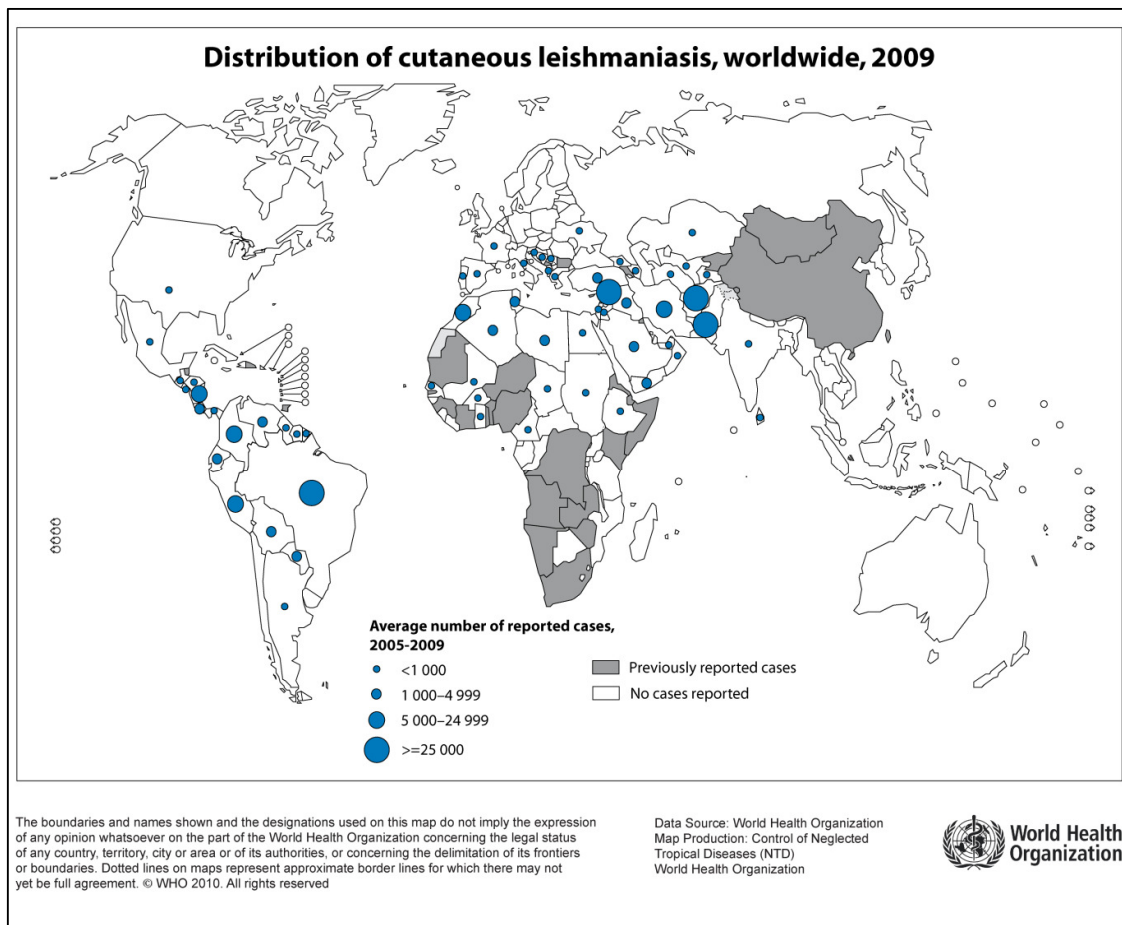


Figura 1: Distribuição mundial da leishmaniose 2009 (29).

1.1.4 Agentes Etiológicos

Acredita-se que existam catorze espécies de *Leishmania* reconhecidas dentro dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* relacionadas com a potencialidade de causar a LC (33). Os estudos recentes sobre o espectro clínico e imunopatológico da doença causada pela *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* despertaram o interesse sobre as competências imunopatogênicas destas duas espécies de *Leishmania* (33).

Dentre as espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* possui grande distribuição em várias regiões. Outras espécies de *Leishmania* também atingem, significativamente, o país, como a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Viannia) guyanensis* (24, 31, 33).

A LC é causada, principalmente, pela *Leishmania major* na Europa, África e Ásia, enquanto, no continente americano, pelas espécies *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania amazonensis* (34). Esta última pode causar a leishmaniose cutânea difusa que é a manifestação mais grave da infecção causada pela *Leishmania amazonensis* (34).

1.1.5 Ciclo de vida das *Leishmanias*

Os macrófagos são as células alvos das *Leishmanias* e, sendo assim, seu papel na imunidade torna-se comprometido uma vez que são responsáveis pela fagocitose de microrganismos e liberação de interleucinas no processo inflamatório (35). No caso da leishmaniose, o patógeno resiste à atividade fagocítica por reverter a maquinaria de ataque (36).

O ciclo de vida desse protozoário inclui uma fase extracelular, dentro do trato digestivo do invertebrado, e uma intracelular, dentro de macrófagos dos mamíferos (21). As formas de *Leishmanias* infectantes que são transmitidas para o hospedeiro são chamadas metacíclicas e as não infecciosas são as procíclicas (33, 38). No entanto, ambas são encontradas em culturas de células livres, no qual as procíclicas se proliferam e se diferenciam em metacíclicas, sendo estas mais abundantes na fase estacionária da cultura. Neste processo, uma variedade de genes apresenta diferentes expressões padrões, algumas das quais, codificam fatores virulentos (21).

As *Leishmanias* são transferidas para o hospedeiro no estado de promastigota (alongada com um flagelo externo), no qual são fagocitadas por diferentes células fagocíticas do hospedeiro. Dentro das células do fagócito mononuclear, as promastigotas se diferenciam para amastigotas (forma arredondada sem o flagelo) (Figura 2). Em seguida, se proliferam, estabilizando a infecção (26).

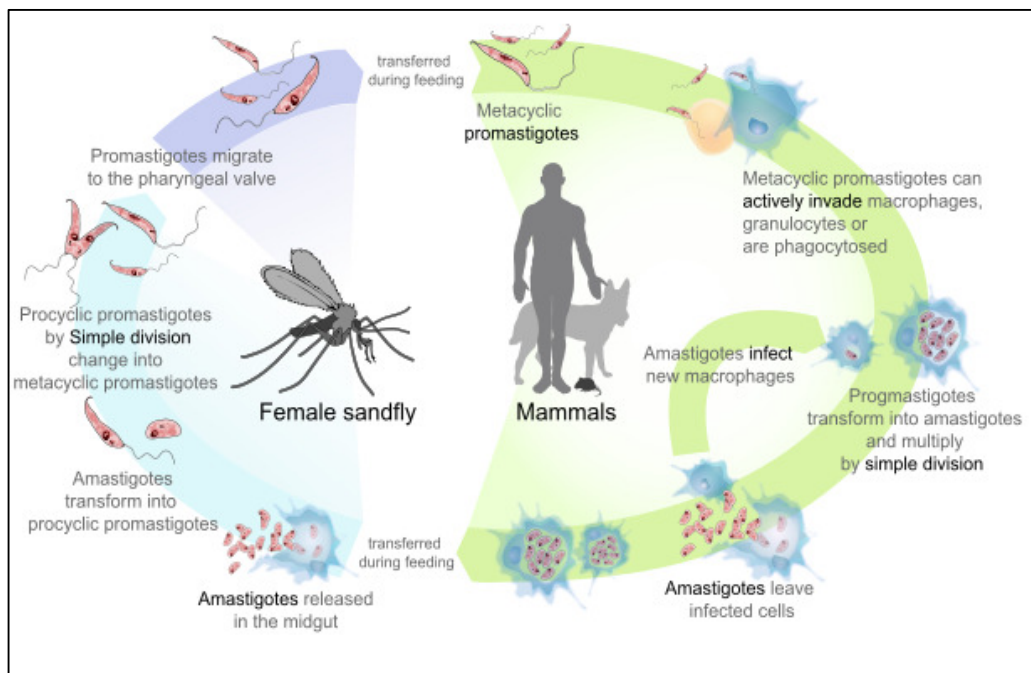


Figura 2: Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania* (57).

A invasão do patógeno não causa a doença em si, mas é necessária para estabelecer a infecção sendo um pré-requisito para a virulência (39). Dois mecanismos de virulência da *Leishmania* têm sido propostos por envolver dois grupos diferentes de moléculas do parasita. Um grupo é constituído, principalmente, na superfície celular e em substâncias secretadas. O outro grupo inclui moléculas intracelulares, chamadas patoantígenos. O primeiro grupo é formado por determinantes invasivos, os quais protegem não só os parasitas, mas, também, evitam que as células do hospedeiro sofram lise prematuramente. Assim, esses determinantes ajudam as amastigotas a manterem, continuamente, a infecção através do crescimento baixo em vacúolos parasitóforos dos macrófagos do hospedeiro. No entanto, esse mecanismo não é responsável pelas manifestações clínicas. Provavelmente, essas sejam decorrentes do segundo grupo, pois causam a imunopatologia da doença. Essas moléculas são altamente conservadas por proteínas citoplasmáticas, nas quais são encontradas por possuírem epíteto *Leishmania*-único, imunologicamente ativo na leishmaniose. Os antígenos intracelulares se expõem ao sistema imune do hospedeiro e os parasitas passam por citólise periódica durante a infecção natural (39).

1.1.6 Formas Clínicas da Leishmaniose

As formas clínicas da doença no homem são: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose visceral (LV), sendo esta conhecida como Kalazar. Na América Latina, 2-5% dos pacientes desenvolve a forma mucosa da doença anos após o tratamento do episódio clínico inicial da LC (40).

A LM provoca extensa destruição das cavidades oronasal e faríngea, com lesões desfigurantes, mutilação da face e grande sofrimento ao paciente. Embora em sua maioria esteja relacionada com as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (América), como *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, foi também relatado no Velho Mundo (África, Ásia e Europa), devido a *L. donovani*, *L. major* e *L. infantum*, pacientes imunossuprimidos (42).

A LV, forma mais grave da doença (sempre fatal se não tratada), é caracterizada por febre irregular, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e anemia. O paciente com LV pode desenvolver a forma crônica da LC, conhecida como leishmaniose dérmica pós-kalazar, do qual necessita de um longo período de tratamento (42).

A LC apresenta-se na forma de lesões na pele que podem manifestar-se de modo localizada, disseminada e cutânea difusa (LCD). A forma localizada é mais comum e desenvolve um espectro clínico localizado, mantido pela moderada hipersensibilidade por células T; observam-se lesões cutâneas em uma região única ou múltipla (33). Por sua vez, as lesões disseminadas são ulceradas e pequenas, às vezes acneiformes, distribuídas por todo o corpo (disseminação hematogênica). As formas localizadas e disseminadas respondem melhor à terapêutica tradicional, mas correspondem às formas mais severas da doença (24, 33). A LC, quando desenvolve lesões múltiplas, incapacita o indivíduo devido às lesões desfigurantes (42).

1.1.7 Tratamento

1.1.7.1 Tratamento de Primeira Escolha

Os antimoniais pentavalentes (Sbv) têm sido adotados há mais de meio século para tratamento de doenças parasitárias (48). Os compostos Sbv são preconizados como fármacos de primeira escolha pela OMS para o tratamento da LC na forma de antimoniato de N- metilglucamina (Glucantime ®), nos países de língua não inglesa, e estibogluconato de sódio (Pentostam ®), nos países de língua inglesa (44, 45, 46, 47). A dose recomendada de Sbv pela OMS é de 20mg/kg/dia, via parenteral, durante 20-28 dias (47).

Embora sejam os fármacos de primeira linha e apresentem bons resultados clínicos no tratamento da LC, cada um dos diversos fármacos para o tratamento da leishmaniose apresenta eficácia limitada e desvantagens como: administração parenteral diária (exceto para a miltefosina, que administrada por via oral), efeitos adversos, toxicidade, tratamento longo, necessidade de hospitalização e acompanhamento constante (46, 48). Além disso, tem sido relatada a existência de resistência das *Leishmanias* a esses fármacos (13, 45, 50, 51, 52, 53). A maioria dos pacientes tratados apresenta, também, alterações das enzimas pancreáticas e dores abdominais (45).

No Mediterrâneo, a anfotericina B lipossomal é o tratamento de primeira escolha para pacientes imunocompetentes (46). O tratamento da LC pode ser local ou sistêmico dependendo da evolução da lesão, da espécie de *Leishmania* envolvida, da possibilidade de disseminação e implicações estéticas e funcionais (46). As recomendações da OMS para o tratamento da LC com antimoniais são por via intralesional e endovenosa, de acordo com a espécie e aspectos clínicos (49). A infiltração local por antimoniais pentavalentes tem sido usada no Velho Mundo para leishmaniose cutânea localizada (49).

Ao mesmo tempo que surgem novas terapias, nos últimos 20 anos, observa-se que os Sbv padrões estão sendo ameaçados pelo desenvolvimento de resistência, o que desfavorece sua utilização na rotina clínica (46, 47). Esse aumento crescente pode ser complicado pela interação do fármaco com a resposta imune do hospedeiro, variações na farmacocinética e variação na sensibilidade das

espécies de *Leishmania* aos componentes do fármaco (46). Entretanto, as novas formulações para liberação de antimoniais pentavalentes estão sendo desenvolvidas e representam um campo promissor (37).

1.1.7.2 Tratamento de Segunda Escolha

Os fármacos de segunda escolha são adotados quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade de seu uso (31). Esses fármacos receberam esse status, pois, antigamente, eram considerados mais propensos a causar efeitos tóxicos sérios ou irreversíveis (por exemplo, insuficiência renal) (46).

Contudo, nos últimos anos esses agentes estão sendo reintroduzidos, com o benefício de novas formulações ou regimes de dosagem, para uso em algumas configurações. Esse grupo é representado, principalmente, pelo isotionato de pentamidina e pela anfotericina B (9, 53, 54). O primeiro é administrado por via parenteral e tem alta toxicidade, principalmente para idosos, cardiopatas e nefropatas, dificultando o seu emprego, porém é usado na América do Sul para tratar a LC, especialmente quando causada por *L. guyanensis*, por essa ser pouco sensível aos antimoniais (9, 53, 54). Por outro lado, a anfotericina B possui reconhecida ação leishmanicida, principalmente, no tratamento das lesões mucosas e é indicada como primeira opção no tratamento de pacientes gestantes com LC e/ou com coinfeção *Leishmania*/HIV (31, 56).

A dose inicial da anfotericina B é de 0,5 mg/kg/dia, devendo ser aumentada gradativamente até 1 mg/kg/dia por via endovenosa, conforme a tolerância do paciente. A administração deve ser feita em dias alternados, respeitando-se o limite máximo de 50mg (1 frasco) por aplicação, até a dose total de 1 a 1,5g para LC e de 2,5 a 3g para leishmaniose mucosa ou leishmaniose mucocutânea (53, 55, 56).

No entanto, apesar dos reconhecidos efeitos terapêuticos da anfotericina B, a maioria do pacientes apresenta alguns efeitos adversos como febre, náuseas, vômitos, cefaléia, hipotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas (9, 53, 54, 55).

A via de administração endovenosa e os problemas cardio e nefrotóxicos impossibilitam seu uso fora do ambiente hospitalar (31). A função renal anormal ocorre na maioria dos pacientes após a administração de doses múltiplas de micelas carregando anfotericina B e o tratamento deve ser interrompido para evitar danos no tecido (58).

As propriedades biofarmacêuticas desfavoráveis da anfotericina B contribuem para a baixa solubilidade e fraca biodisponibilidade oral (55). A anfotericina B não é absorvida no trato gastrointestinal, o que limita a sua administração por via oral e, por isso, é administrada por via parenteral para o tratamento de infecção fúngica sistêmica ou leishmaniose visceral (46, 55).

Apesar do aumento do uso da anfotericina B, especialmente em formulações lipídicas que possuem tempo de meia vida maior, sua resistência clínica é rara (46).

Atualmente, a anfotericina B desoxicolato possui uma taxa de 97% de cura com nenhum reporte de recidiva. No entanto, tem se observado uma diminuição na sensibilidade e diversas recaídas em casos isolados (59).

1.1.7.3 Anfotericina B

A anfotericina B é um macrolídeo extraído da *Streptomyces nodosus* descrito a primeira vez em 1950. Trata-se de um antimicrobiano fúngico de amplo espectro usado primariamente no tratamento de infecções sistêmicas que representem risco (60). Por seu amplo espectro de atividade, abrange um grande número de espécies de fungos, como o *Paracoccidioides brasiliensis*, bem como espécies de protozoários *Leishmanias* e espécies de amebas do gênero *Naegleria* (61).

De acordo com sua constituição química, a molécula possui sete ligações duplas ao longo da porção hidrofóbica do anel, além de vários grupos hidroxila nas regiões hidrofílicas e um resíduo micosamina (lactona) (61, 62, 63) (Figura 3).

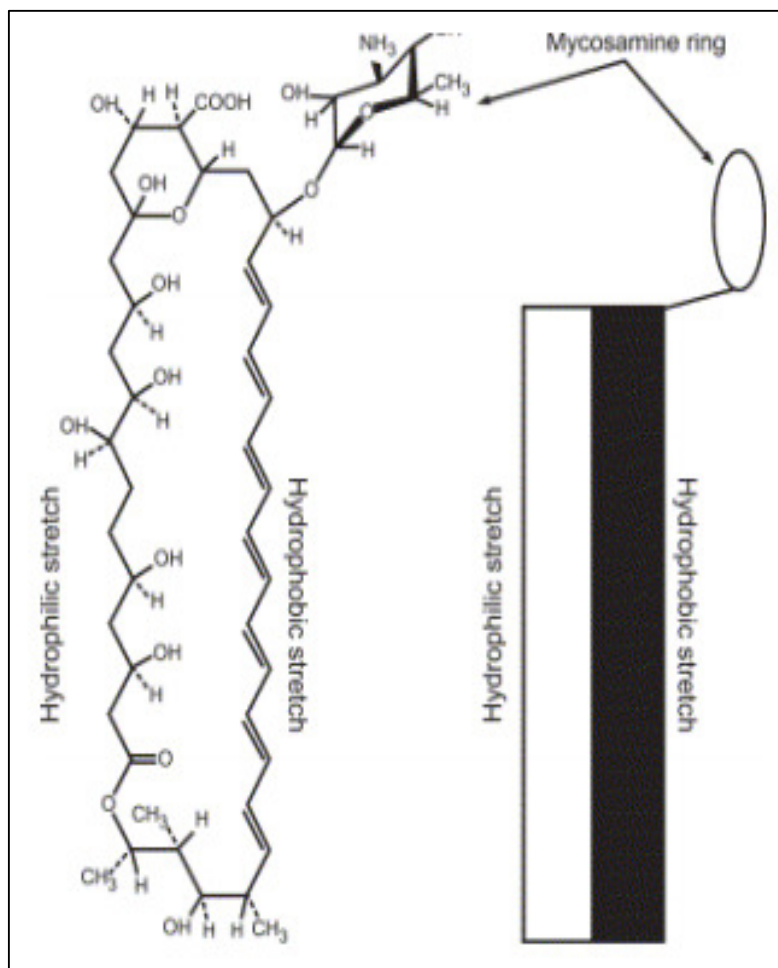


Figura 3: Estrutura química da molécula do antimicrobiano anfotericina B (61).

A formulação convencional clínica da anfotericina B é constituída por micelas do detergente desoxicolato de sódio, o que leva à sua rápida libertação (61, 63). Essa forma é a mais indicada para tratamento de infecções sistêmicas causadas por espécies de fungos, apesar dessa suspensão micelar poder induzir toxicidade (61, 63, 64).

Tanto o efeito terapêutico como o efeito tóxico da anfotericina B desoxicolato (D-anfoB) derivam da interação com lipídeos presente na membrana celular. Isso se deve à alta afinidade da anfotericina B pela molécula de ergosterol, presente nas membranas celulares dos fungos, e pela molécula do colesterol, análogo ao ergosterol nas células de mamíferos, o que favorece a formação de poros, permitindo o extravasamento de eletrólitos e outros componentes celulares. No entanto, essa especificidade pela membrana celular humana, propicia a formação de

poros na membrana celular no hospedeiro, o que explica a alta toxicidade no organismo (61).

A eficácia terapêutica da D-anfoB é limitada também por sua baixa solubilidade em solução aquosa e outros fatores (62). Tem um perfil de solubilidade muito limitado, sendo quase insolúvel em água, mas moderadamente solúvel em alcoóis e em solventes orgânicos, como dimetil-sufóxido (DMSO) e dimetil-formamida (DMF). Em água, a D-anfoB se agrega formando primeiro dímeros por aposição das 2 faces hidrofóbicas seguidas por grande agregados (61).

A D-anfoB afeta o sistema imune e, em particular, pode regular as funções dos macrófagos como a produção de citocinas como a interleucinas1 e o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), bem como quimiotaxia e fagocitose. Essas propriedades podem contribuir para a atividade do antimicrobiano D-anfoB, mas pode também aumentar a toxicidade dela, como, por exemplo, febre e calafrio (61).

Apesar da sua importância terapêutica, as propriedades fisicoquímicas da D-anfoB propiciam dificuldades na sua formulação e administração, como a baixa bioviabilidade por via oral (61). Alguns estudos sugerem que formulações baseadas em lipídios ou outras moléculas anfifílicas podem ser a alternativa para contornar esse problema (61).

Acredita-se, portanto, que os benefícios farmacológicos e clínicos da D-anfoB possam ser associados como a segurança e eficácia das nanopartículas, sendo que alguns testes com a D-anfoB nanoestruturada já foram realizados *in vitro* e *in vivo* (61, 65, 66).

Quando nanoestruturada, a D-anfoB seria capaz de exercer sua atividade leishmanicida com maior eficácia terapêutica e baixa toxicidade. O mecanismo provável para essa diminuição de toxicidade seria pelo fato das nanopartículas carregadas com o agente antimicrobiano, serem incorporadas por vacúolos intracelulares de macrófagos onde o patógeno está sendo armazenado (67). Desse modo, o fármaco agiria eliminando diretamente o agente causador da LC sem que haja a liberação de mediadores químicos (19).

1.1.8 Nanotecnologia e Materiais Nanoestruturados

As nanopartículas funcionam como sistemas carreadores de fármacos adequados para administração oral, parenteral e tópica, os quais incluem nanossistemas, tais como lipossomas e microssistemas, como micropartículas, emulsões múltiplas e microemulsões (14).

A incorporação de fármacos em nanopartículas de polímeros biocompatíveis tem vantagens sobre outros sistemas devido a facilidade da preparação, vida útil mais longa e maior estabilidade nos fluidos biológicos (68). Nanopartículas preparadas com poli(lactato) biodegradável têm sido propostas como um sistema passivo de liberação de fármacos em macrófagos que poderia aumentar a ação terapêutica leishmanicida do fármaco (12, 69).

Novos agentes quimioterápicos demonstram a ação leishmanicida da DMC (29,69-diidroxi-49-methoxychalcone), encapsulada por nanopartículas de poli(D, L ácido láctico) (PLA) *in vitro* e *in vivo* que favorecem a viabilidade e a eficácia do fármaco para o correto direcionamento do sítio específico. A molécula de DMC, extraída da erva *Piper aduncum*, já havia sido descrita pela sua eficácia e seletividade contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis in vitro* (70). A vantagem desse polímero está associada a sua degradação a ácido láctico, no qual é eliminado na urina e exalado como CO₂ (70).

Segundo estudo de Amaral e colaboradores (2009), a anfotericina B, associada com nanopartículas de PLGA (do inglês, *polylactic-co-glycolic acid*) com DMSA (do inglês, *dimercaptosuccinic acid*), é eficaz contra o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose (Pbmicose), em camundongos infectados, mesmo quando administrada com intervalo de tempo maior entre cada dose (a cada três dias) com menos efeitos nefro e hepatotóxicos (71). A nanopartícula de PLGA, composta de ácido láctico e ácido glicólico, possibilita liberação gradual, biocompatibilidade e segurança ao complexo formado com a molécula do fármaco (72, 73). O DMSA é a molécula de reconhecimento celular que possui alta afinidade pelo epitélio pulmonar, a primeira região do corpo a ser atacada pelo fungo da Pbmicose. No trabalho relatado, escolheu-se a anfotericina B em formulação nanoestruturada por este ser o fármaco mais eficaz no tratamento dessa infecção (72).

O sistema de liberação de drogas por PLGA tem sido extensivamente investigado devido a sua versatilidade, biocompatibilidade, viabilidade comercial e degradação hidrolítica (73).

Com base nesses achados e com a perspectiva de se valer do potencial das partículas nanocarreadoras à base de PLGA, espera-se associar os benefícios terapêuticos da anfotericina B para tratar a LC com diminuição dos efeitos tóxicos causados aos pacientes.

1.1.8.1 Nanopartículas magnéticas

Diversos materiais nanoestruturados estão sendo desenvolvidos e as nanopartículas magnéticas surgem como proposta promissora para diversas aplicações na área da medicina como, por exemplo, a magnetohipertemia para tratamento de tumores, entrega de drogas alvo-específico, agente de contraste para imagem por ressonância magnética (74).

As nanopartículas magnéticas podem ser conduzidas até o local do agravo, da lesão da doença, por meio de um gradiente de campo magnético externo, sendo quimicamente controláveis e obtidas pela interação entre diferentes materiais orgânicos e/ou inorgânicos (75). Elas possuem uma grande superfície que pode ser modificada e associada a agentes biológicos tais como proteínas e anticorpos, entre outros (76).

As propriedades das nanopartículas magnéticas permitem que sejam manipuladas mesmo quando introduzidas em um organismo por via endovenosa, por meio de um gradiente de campo magnético externo (77).

Suas propriedades estão diretamente relacionadas ao seu tamanho. Quando administradas a um ser vivo - via endovenosa, via intraperitoneal ou intralesional – o diâmetro médio das nanopartículas pode influenciar diretamente no tempo de permanência no organismo, na velocidade com que atravessa a barreira endotelial e no reconhecimento do sistema mononuclear fagocitário (78).

1.1.9 Magnetohipertermia

O procedimento terapêutico conhecido como hipertermia visa tratar tumores através do aumento de temperatura em determinada região afetada (Figura 4) e, desse modo, espera-se que ocorra a lise das células tumorais (79).

A morte das células tumorais fundamenta-se no princípio de que elas são menos resistentes a aumentos bruscos de temperatura a 41°C - 42°C do que as células saudáveis (79). Esse aumento requerido pela hipertermia pode ser atingido, entre outros métodos, pelo uso de nanopartículas magnéticas, processo conhecido como magnetohipertermia. Quando submetidas à ação de um gradiente de campo magnético externo de frequência alternada, as nanopartículas magnéticas liberam calor, além de poderem ser guiadas a um alvo específico por campos magnéticos externos. A possibilidade da vetorização de nanopartículas magnéticas, através de gradientes de campos magnéticos, estimulou o desenvolvimento de várias técnicas de encapsulamento de partículas magnéticas de forma que os sistemas obtidos se tornassem efetivos carreadores de fármacos com especificidade tumoral para a liberação controlada de agentes quimioterápicos. Um pré-requisito importante para a utilização clínica da magnetohipertermia é que as nanopartículas apresentem baixos níveis de toxicidade e que permita minimizar as doses requeridas (79).

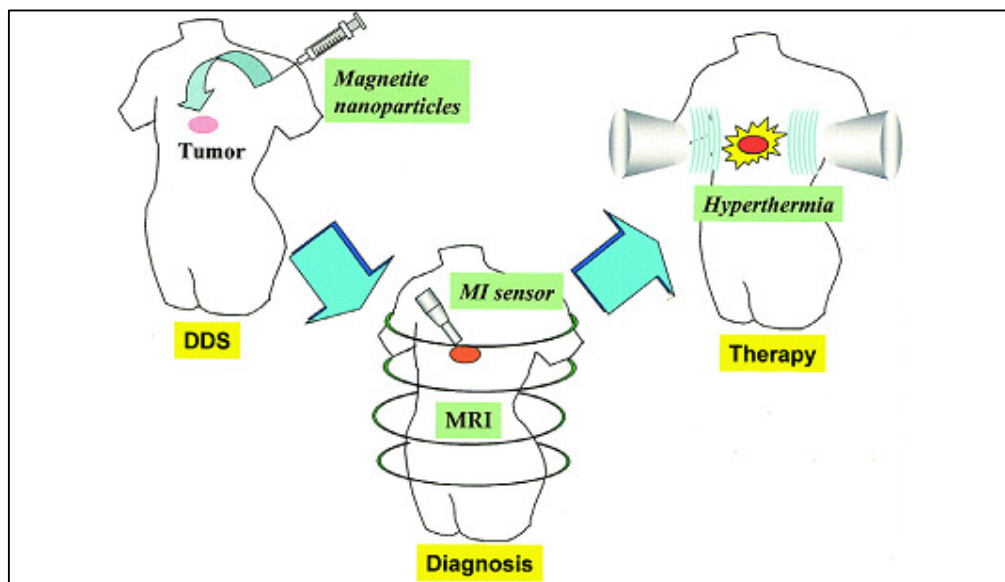


Figura 4: Esquema da estratégia terapêutica usando partículas magnéticas. No caso de tumores, essas nanopartículas se acumulam no lugar via sistema de liberação de fármaco (80).

As nanopartículas magnéticas são cada vez mais empregadas no tratamento de doenças. Isso se torna viável pela baixa toxicidade, biocompatibilidade, via de administração e alto acúmulo no tecido-alvo (80). O uso de nanopartículas magnéticas (monodomínios magnéticos) é preferível às micropartículas (multidomínios magnéticos) uma vez que nanopartículas magnéticas respondem mais eficientemente a campos externos absorvendo destes mais energia (80).

O óxido ferroso ou férrico é o principal constituinte das partículas magnéticas, embora metais como o cobalto e o níquel sejam utilizados em outras áreas. As partículas magnéticas são atraídas pela densidade de fluxo magnético, segmentando o fármaco que eventualmente carregam e propiciando a bioseparação de células (80).

As nanopartículas magnéticas possuem potencial como agentes de contraste em ressonância magnética e mediadores de aquecimento na termoterapia do câncer (hipertermia) (80).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a eficácia *in vivo* da D-anfoB, associada às nanoestruturas de PLGA contendo DMSA e nanopartículas magnéticas à base de maghemita no tratamento da LC experimental causadas pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a ação leishmanicida do complexo anfotericina B associada às nanoestruturas de PLGA contendo DMSA (D-anfoB-Nano) e nanopartículas magnéticas à base de maghemita (D-anfoB-Nano-MG), administrada por via intraperitoneal em camundongos C57BL/6, no tratamento da LC experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.
- II. Avaliar a eficácia da D-anfoB- Nano e da D-anfoB-Nano-MG através das medidas dos diâmetros, das contagens de promastigotas e da viabilidade celular de camundongos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* nos diferentes grupos tratados.
- III. Avaliar a eficácia do D-anfoB-nano-MG em realizar magnetohipertermia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo *in vivo* do tipo experimental ou pré-clínico

3.2 CEPAS DE *Leishmania*

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/PH8) oriundas da OMS, identificadas pela técnica de isoenzimas e anticorpos monoclonais, mantidas em culturas e criopreservadas em nitrogênio líquido (-196°C) no laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Estas culturas são periodicamente inoculadas em hamsters para assegurar a infectividade e garantir a virulência dos inóculos.

3.3 ANIMAIS

Foram adotados, ao todo, 5 grupos (total: 30 animais), sendo que foram 4 grupos de tratamento (Tabela 1) com 6 camundongos isogênicos em cada (total: 24 animais), da cepa C57BL/6, espécie *Mus musculus*, fêmeas adultas, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade de Brasília (Brasília-DF). O quinto grupo foi mantido sem infecção e sem tratamento para servir como controle negativo.

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, que apresenta infra-estrutura adequada para o alojamento dos animais e médico veterinário responsável. Os camundongos ficaram em ambiente controlado de luminosidade, com ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Cada gaiola acondicionou, no máximo, 6 animais, com *água ad libitum* e

ração oferecida à vontade durante todo experimento. Essas gaiolas foram forradas com maravalha esterilizada e, portanto, livre de patógenos.

Os camundongos C57BL/6 foram adotados por ser o modelo experimental que mais se aproxima do modelo humano na resposta ou manifestação da forma LC, ou seja, assemelha-se à leishmaniose cutânea localizada crônica desenvolvida em humanos no Novo Mundo (41).

Ao contrário das lesões causadas por *Leishmania major*, a maioria das lesões em cepas de camundongos infectadas por *Leishmania amazonensis*, como a C57BL/6, não tem cura espontânea. Com isso, as lesões mostram variáveis graus de suscetibilidade à infecção e desenvolvem lesões crônicas que não cicatrizam (34, 82).

Lemos e colaboradores (2000) sugerem que exista um papel importante espécie-parasita na determinação do padrão de resposta imune. Acredita-se que *L. amazonensis* induz uma resposta imune do tipo Th2, enquanto que *L. major* induz uma resposta imune tipo Th1 em Camundongos CBA (83). Acredita-se que a suscetibilidade dos camundongos C57BL/6 para *Leishmania amazonensis* esteja associada à ausência de resposta imune Th1 mas não é controlada exclusivamente por células Th2 (83). A infecção por *L. amazonensis* tem sido relatada em camundongos C57BL/10 por a ausência da resposta do tipo Th1 ser suficiente para causar a multiplicação do parasita e desenvolvimento da lesão (83).

A idade mínima de cada camundongo para o início do tratamento foi de 10 semanas. Os camundongos fêmeas pesavam, em média, 30.6 ± 2.9 g (Tabela 1).

Tabela 1 - Características e especificações dos camundongos empregados para o tratamento da leishmaniose cutânea experimental.

Características	Especificações
Cepa de Camundongo	C57BL/6
Peso Médio por Camundongo	30.6 ± 2.9g
Sexo dos Camundongos	Fêmea
Idade dos Camundongos	10 semanas
Via de Administração	Intraperitoneal
Duração do Tratamento	10 dias

Todos os procedimentos foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal (UnBDOC número 62393/2010).

3.4 AMOSTRAS

O fármaco que foi empregado para o grupo de tratamento controle, a anfotericina B desoxicolato (Anforicin B®, Cristália), foi disponibilizada pelo Hospital Universitário, Universidade de Brasília.

A anfotericina B, associada às nanoestruturas PLGA contendo DMSA (D-anfoB-nano), e a anfotericina B associada às nanoestruturas de PLGA contendo DMSA e nanopartículas magnéticas de maghemita (D-anfoB-nano-MG), γ -Fe₂O₃, com tamanho modal de 9,8nm, foram fornecidas pelo Centro de Nanociências e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília em parceria com o grupo do professor Antônio Claudio Tedesco da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

A concentração original da amostra de nanonopartículas magnéticas à base de maghemita utilizada neste estudo foi de $3,4 \times 10^{13}$ partículas/mL, a de DMSA 0,05 mol/L e anfotericina B 1200 µg/100µL.

3.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOESTRUTURAS

Amostra de D-anfoB-nano e D-anfoB-nano-MG, diluída 1000 vezes em água destilada, foi colocada sobre telas de microscopia eletrônica recobertas com Formvar. Após secarem por duas horas, em temperatura ambiente, as telas apropriadas foram analisadas e fotomicrografadas em um microscópio eletrônico Jeol JEM 101. O sistema de aquisição de imagens do microscópio utilizado foi o UltraScan ® – *software Digital Micrograph 3.6.5* (GATAN, EUA)

3.6 AVALIAÇÃO *IN VIVO* NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Os 6 camundongos de cada grupo foram infectados no coxim plantar direito (Figura 5), via subcutânea, com $3,57 \times 10^6$ promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, em fase metacíclica, cultivados em meio de cultura Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich ®), enriquecido com Soro Fetal Bovino (Gibco ®) 20% e acrescido de sulfato de gentamicina (Laboratório Hipolabor ®) 0,2%, a 37°C.

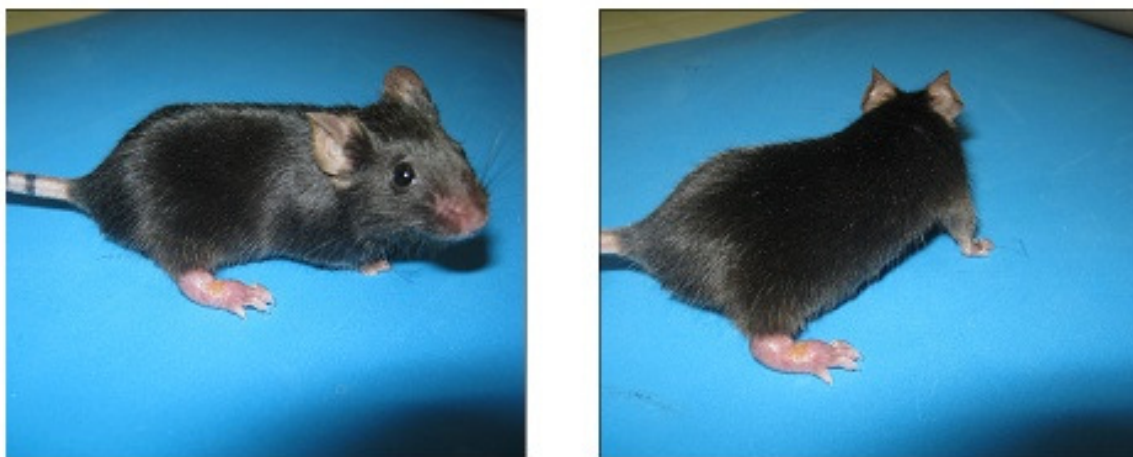


Figura 5: Camundongo da cepa C57BL/6, espécie *Mus musculus*, fêmea adulta infectada no coxim plantar direito via subcutânea, com $3,57 \times 10^6$ promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, em fase metacíclica.

Dois meses após a inoculação, a infecção foi confirmada através das culturas e esfregaços de secreções contendo linfas das patas inoculadas. Para isto, foram extraídas amostras de linfa, por punção, das patas inoculadas para a realização de culturas (suspensas no meio bifásico Nove-McNeal-Nicolle-NNN) e pesquisa de amastigotas em esfregaços corados pela coloração de Giemsa.

3.7 TRATAMENTO COM ANFOTERICINA B

O tratamento foi iniciado dois meses após a inoculação, tendo os animais sido distribuídos nos seguintes grupos (Tabela 2) e esquema de tratamento (Tabela 3):

Tabela 2 - Grupos de tratamento e respectivas doses usadas durante 10 dias para o tratamento camundongos fêmeas da cepa C57BL/6, espécie *Mus musculus*, portadores de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Grupo	Tratamento	Dose por animal a cada aplicação	Dose total, por animal, ao final do 10º dia de tratamento
1	Grupo Placebo - PBS 1%	-	-
2	D-anfoB	2mg/Kg/dia	60mg
3	D-anfoB-Nano	6mg/Kg a cada 3dias	60mg
4	D-anfoB-Nano-MG	6mg/Kg a cada 3dias	60mg

Os grupos D-anfoB-nano e D-anfoB-Nano-MG receberam o tratamento em intervalo de 3 dias entre cada aplicação (Tabela 2 e Tabela 3), a fim de evitar estresse nos animais.

O grupo D-anfoB-Nano-MG foi submetido a um campo magnético com corrente alternada - amplitude 40 Oe de campo magnético - oscilando em 1Mhz para produzir magnetohipertermia (Figura 6). As lesões foram expostas ao campo alternado por 10 minutos, de acordo com protocolo descrito por Portilho e colaboradores (2011) (85).

Tabela 3 - Esquema diário das doses dos medicamentos usados para cada camundongo, de acordo com o grupo de tratamento correspondente no período de 10 dias.

	PBS 1%	D-anfoB	D-anfoB- nano	D-anfoB-nano-MG
1º dia	-	0,06mg	0,18mg	0,18mg
2º dia	-	0,06mg	-	-
3º dia	-	0,06mg	-	-
4º dia	-	0,06mg	0,18mg	0,18mg
5º dia	-	0,06mg	-	-
6º dia	-	0,06mg	-	-
7º dia	-	0,06mg	0,18mg	0,18mg
8º dia	-	0,06mg	-	-
9 dia	-	0,06mg	-	-
10º dia	-	0,06mg	0,06mg	0,06mg
Total por animal	-	0,60mg	0,60mg	0,60mg

Para a realização dessa terapia, os animais deste grupo foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec) 80mg/kg e xilazina (Calmun®, Agener União) 10mg/kg. Este último produz um bom efeito sedativo-analgésico quando associado ao anestésico, como é o caso da cetamina. Este procedimento foi adotado visto que os animais necessitam permanecer imóveis por um período de 10 minutos para receber o campo produzido pelo equipamento de magnetohipertermia, além de evitar dor e sofrimento. O procedimento de magnetohipertermia foi aplicado assim que foi observado o efeito sedativo-analgésico nos animais.



Figura 6: Aparelho de magnetohipertermia (Laboratório NanoGem).

3.8 VIA DE ADMINISTRAÇÃO

A via de administração adotada neste trabalho foi a intraperitoneal, pois ela oferece grande superfície de absorção a partir da qual as substâncias entram rapidamente na circulação sanguínea. A absorção se faz melhor através do peritônio visceral; parte da substância passa pelo fígado e sofre metabolização antes de atingir a circulação sistêmica. No tratamento de humanos com D-anfoB, a via adotada é a endovenosa.

3.9 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DAS DOSAGENS

Após o tratamento, os animais foram avaliados por meio dos seguintes critérios:

3.9.1 Medição das patas

O diâmetro da pata inoculada dos camundongos foi medido por meio de paquímetro (Mitutoyo ®), com precisão de décimos de milímetro, em dois momentos em relação ao tratamento:

- O primeiro ocorreu antes do início do tratamento, sendo uma medida antes e a outra depois da inoculação das *Leishmanias*.
- O segundo, 24 horas e 10 dias após o tratamento.

A seguir foi realizada a comparação dos diâmetros de cada um dos grupos após o tratamento com os valores encontrados pré-tratamento e entre os grupos tratados entre si.

3.9.2 Diluição Limitante

A diluição limitante é um método para estipulação da quantidade provável de formas amastigotas de *Leishmanias* viáveis na pata do animal.

Após o tratamento foi escolhido, aleatoriamente, dois animais de cada grupo de tratamento (84). Em seguida, estes foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas (coxim plantar direito) foram submetidas à técnica de dissecação asséptica, que consiste na trituração dessas em 1,5 mL de meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (RPMI Medium 1640 (Gibco®)), enriquecido com 20% de Soro Fetal Bovino e 0,2% de sulfato de gentamicina. Em cada poço da placa tipo ELISA fundo chato, com 96 poços (LabTech, Melbourn, Inglaterra), foi colocado 150µL do conteúdo do macerado em sucessivas diluições de 10 vezes. Para cada grupo, o teste foi realizado em triplicata. O material foi mantido por 72 horas em estufa tipo BOD a 26°C. Havendo formas amastigotas, estas passaram e se multiplicaram em formas promastigotas após cerca de 24 a 72 horas em estufa a 26°C. A placa foi observada, diariamente, em microscópio de luz invertida com objetiva de 40 vezes, onde foi observada a presença ou ausência de formas promastigotas em cada poço. O número de parasitas por pata foi analisado através do programa ELIDA® (86, 87).

3.9.3 Ação das nanocápsulas de PLGA contendo anfotericina B desoxicolato, DMSA e nanopartículas magnéticas sobre a viabilidade celular das *Leishmania* nos camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Para avaliar a ação de nanocápsulas de PLGA contendo anfotericina B desoxicolato, DMSA e nanopartículas magnéticas sobre a viabilidade celular das *Leishmanias*, foi empregado o método colorimétrico (87), que utiliza o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolina (MTT). Este método avalia indiretamente a viabilidade celular pela atividade da enzima succinato-desidrogenase presente nas mitocôndrias celulares. Isso é possível porque o MTT é um sal tetrazólico de cor amarelo ouro, que quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado pelas enzimas mitocondriais formando cristais de formazan,

insolúveis e de cor púrpura, que se acumula nas células devido a sua incapacidade de atravessar a membrana celular. A quantidade de formazan produzida é, por conseguinte, diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes em cada poço, ao qual foi adicionado o MTT (88, 89, 90).

Após o período de incubação descrito no item acima, foi acrescentado 15µL (5mg/mL) de MTT (Invitrogen ®), a placa foi mantida por mais 4 horas a 26° C na estufa, a 5% de CO₂ no ar, e, em seguida, foi acrescentado 60 µL de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 10% em cada poço. Após essa etapa, a placa foi novamente incubada *over night* por 12 horas na estufa, para solubilizar os cristais de formazan formados após a adição do SDS e para melhorar o espectro de absorbância da solução. O material da placa foi analisado pelo espectrofotômetro (SpectraMax® Plus384 microplate reader) (Figura 7).



Figura 7: Espectrofotômetro(SpectraMax® Plus384 microplate reader).

Os resultados foram analisados através da absorbância em comprimento de onda na faixa de 570nm de cada poço.

Os resultados foram expressos em percentual de redução do MTT pelas

Leishmanias, que foram expressas a partir das absorvâncias lidas pelo espectrofotômetro, tendo como parâmetro o grupo controle negativo (animais não infectados) para o qual se atribuiu 100% de redução do MTT.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do *software* SPSS® 17.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*), que calculou o número provável de amastigotas por pata estudada (92). Foi efetuado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificar a distribuição dos dados. Como todos os dados apresentavam distribuição normal ($P > 0,05$) optou-se pela análise de variância paramétrica (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Os gráficos foram plotados com o programa Graph Prism ® versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E DAS NANOPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As nanopartículas foram caracterizadas quanto aos seus aspectos estruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão. A imagem captada da amostra D-anfoB-Nano mostra nanoestruturas de PLGA (P) (Figura 8A). A Figura 8B mostra, além das nanoestruturas de PLGA, nanopartículas magnéticas (NP) presentes na amostra D-anfoB-Nano-MG (Figura 8).

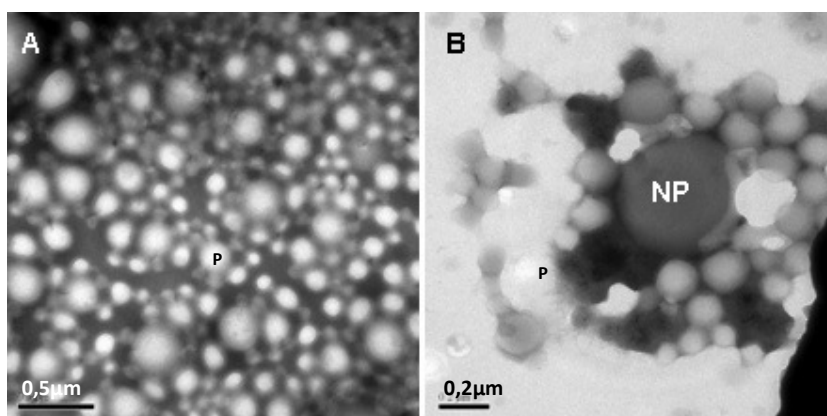


Figura 8: Imagens captadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas usadas no tratamento da leishmaniose cutânea em camundongos C57BL/6. Figura 8A, D-AMB encapsulada em nanoestruturas de PLGA contendo DMSA (D-anfoB-Nano). Figura 8B, D-anfoB-Nano-MG encapsulada em nanoestruturas de PLGA contendo DMSAe nanopartículas magnéticas à base de maghemita (D-anfoB-Nano-MG). As letras marcadas correspondem: ao centro das nanopartículas de maghemita (NP) e PLGA (P), respectivamente.

4.2 MEDIDAS DAS LESÕES CUTÂNEAS (DIÂMETRO DAS PATAS) APÓS 24 HORAS E 10 DIAS DO INÍCIO DO TRATAMENTO

Para avaliar a evolução do diâmetro da pata ao longo do tratamento, as patas dos animais foram medidas com paquímetro. Os resultados obtidos foram apresentados na Figura 9.

Os animais infectados não tratados (grupo *Leishmania*, $n=6$) mostraram mesmo diâmetro durante todo período pós-infecção. A redução da medida das lesões das patas permaneceu estável ao longo do tratamento. Independentemente do grupo de tratamento, grupo D-anfoB ($n=6$), grupo D-anfoB-Nano ($n=6$) e grupo D-anfoB-Nano-Mg ($n=6$), não houve diferença significativa no diâmetro das patas entre os períodos de 24 horas ($3,50\pm 0,37$; $3,54\pm 0,09$; $3,74\pm 0,37$, respectivamente) e 10 dias pós-tratamento ($3,90\pm 0,24$; $3,69\pm 0,24$; $3,77\pm 0,45$, respectivamente) (Anexo B).

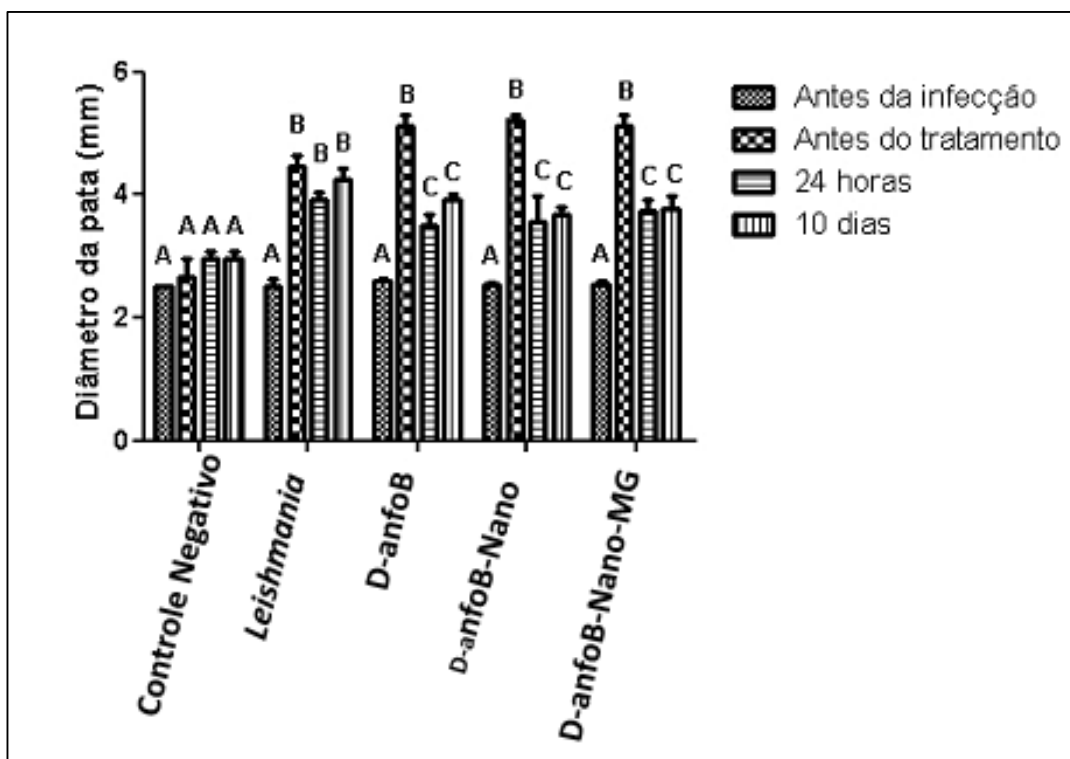


Figura 9: Distribuição do diâmetro da pata (mm) de camundongos C57BL/6 infectados ($n=30$) por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Letras diferentes indicam diferença estatística dentro de cada grupo experimental ($P<0,05$, ANOVA *one-way*, pós teste de Tukey): Grupo 1 (Sem infecção), Grupo 2 (PBS 1%), Grupo 3 (D-anfoB), Grupo 4 (D-anfoB encapsulada em nanoestruturas de PLGA contendo DMSA (D-anfoB-Nano)) e Grupo 5 (D-anfoB encapsulada em nanoestruturas de PLGA contendo DMSA e nanopartículas magnéticas à base de maghemita (D-anfoB-Nano-MG)).

De forma geral, o tratamento reduziu o tamanho do diâmetro da pata de camundongos tratados, porém esta redução não alcançou, em média, o diâmetro antes da infecção.

4.3 RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE PARASITAS NAS PATAS DOS CAMUNDONGOS

A seguir, foi realizado exame parasitológico para verificar a presença de parasitas nas patas com lesão nos diferentes grupos de tratamento. Para isso, os dados numéricos foram obtidos a partir da contagem do número de parasitas nos poços, nos quais houve crescimento de promastigotas de *Leishmanias*, verificado pela leitura em microscópio de luz invertida, e calculada a média dos valores obtidos para os grupos de tratamento pelo programa Elida ®.

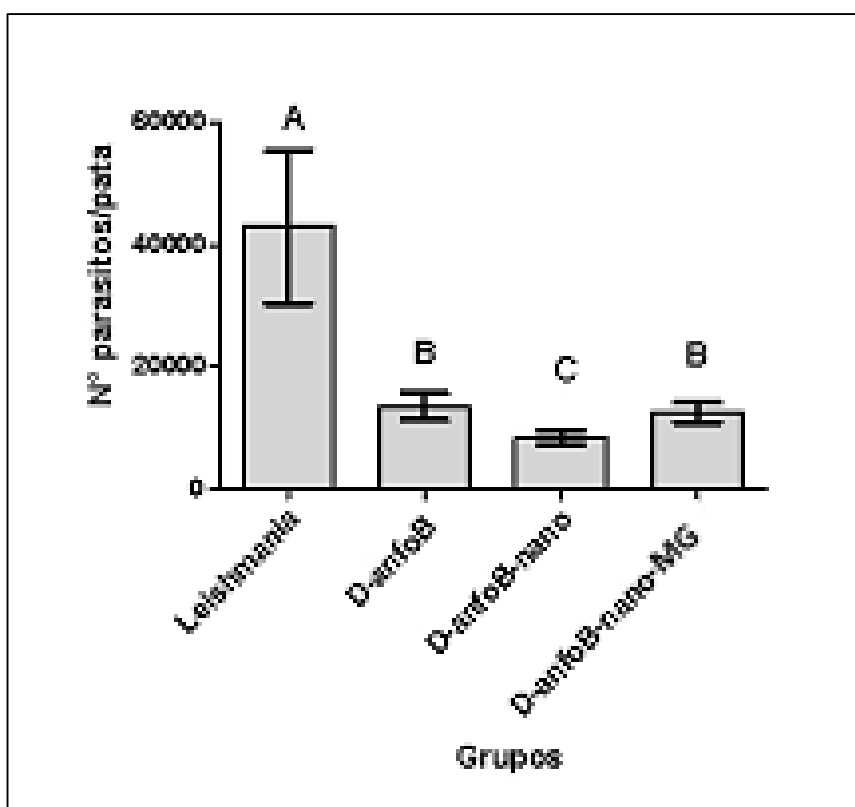


Figura 10: Distribuição do número de parasitas por pata de camundongos C57BL/6 infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Letras diferentes indicam diferença estatística dentro de cada grupo experimental ($P < 0,05$, ANOVA one-way, pós teste de Tukey). As barras de erro indicam o intervalo de confiança da média a 95%.

Pela distribuição do número de parasitas por pata, verificou-se que todos os tratamentos reduziram a quantidade de *Leishmanias*: D-anfoB (13.536 ± 2.100); D-anfoB-nano (8.532 ± 1.055); D-anfoB-nano-MG (12.534 ± 1.532), conforme figura 10.

Enquanto o grupo D-anfoB-nano apresentou grande diferença na quantidade de parasitas em relação ao grupo D-anfoB, o grupo o D-anfoB apresentou pequena diferença em relação ao grupo D-anfoB-nano-MG.

4.4VIABILIDADE CELULAR

No teste de viabilidade celular, os dados foram normalizados em relação ao controle negativo. A contagem do número de *Leishmanias* viáveis foi possível através da análise do teste de diluição limitante, que permitiu avaliar a distribuição da percentagem de *Leishmanias* viáveis de acordo com cada grupo experimental testado.

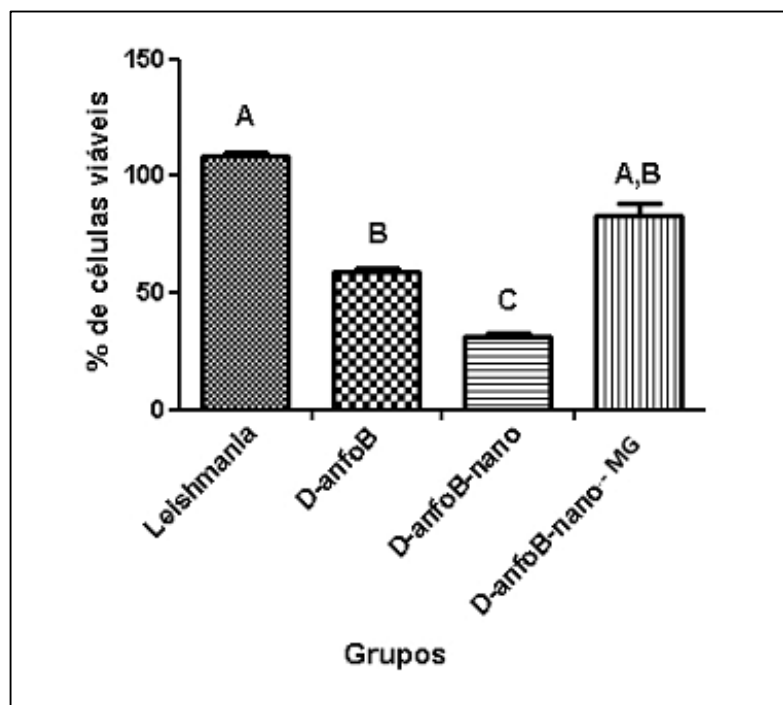


Figura 11: Distribuição do percentual de *Leishmanias* viáveis de camundongos C57BL/6 infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Letras diferentes indicam diferença estatística dentro de cada grupo experimental ($P < 0,05$, ANOVA *one-way*, pós teste de Tukey): Grupo 1 (PBS 1%), Grupo 2 (D-anfoB), Grupo 3 (D-anfoB encapsulada em nanoestruturas de PLGA contendo DMSA (D-anfoB-nano)) e Grupo 4 (D-anfoB encapsulada em nanoestruturas de PLGA contendo DMSA e nanopartículas magnéticas à base de maghemita (D-anfoB-nano-MG)).

De acordo com a Figura 11, todos os grupos de tratamentos com anfotericina B reduziram, significativamente, o número de parasitas viáveis das patas D-anfoB ($58,81 \pm 8,59\%$); D-anfoB-nano ($31,22 \pm 10,18\%$); D-anfoB-nano-MG ($82,92 \pm 31,88\%$), respectivamente, e essa redução foi maior para o tratamento com D-anfo-nano.

5 DISCUSSÃO

O tratamento farmacológico para LC não tem apresentado resultados clínicos desejáveis e nenhuma vacina eficaz está disponível no mercado. A resistência dos parasitas aos medicamentos disponíveis e os períodos prolongados de tratamento justificam a urgente necessidade de busca de substâncias e técnicas alternativas, com esquemas de tratamento com períodos mais curtos e de baixo custo (30, 93).

Neste contexto, vários compostos foram estudados, porém, nenhum dos testados ou mesmo em uso apresentaram eficácia e segurança adequadas (94, 95). Esse panorama vem corroborar com observações da OMS onde se recomenda a pesquisa de novos fármacos e formulações, bem como de vias de administração mais simples e seguras, como as vias oral e tópica (2, 96). Apesar da eficácia clínica da anfotericina B, observa-se que os pacientes tratados, normalmente, sofrem algum tipo de reação adversa decorrente dos efeitos tóxicos desse fármaco (61). Baseando-se em estudos realizados com D-anfoB-nano, para tratar o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose (Pbmicose) em camundongos infectados, observou-se eficácia terapêutica maior e baixa toxicidade quando comparados às terapias tradicionais (71).

Para este fim, muitos medicamentos antineoplásicos foram testados com sucesso usando formulações com nanopartículas de PLGA contendo DMSA apresentando eficácia antifúngica, menos efeitos indesejáveis e intervalo entre as dosagens favoravelmente estendido (71).

Os nossos achados demonstraram que os animais infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratados com D-anfoB ou D-anfoB-nano ou D-anfoB-nano_MG reduziram o tamanho do diâmetro da pata, porém, a associação D-anfoB-nano-MG não contribuiu para um melhor desempenho nesta redução, conforme foi demonstrado na figura 9.

Acredita-se que as drogas nanoestruturadas sejam mais eficazes que as terapias tradicionais na eliminação de microrganismos patogênicos sem liberar diretamente mediadores químicos (19). Em nosso estudo, D-anfoB-nano não melhorou o desempenho em relação ao obtido pelo fármaco tradicional (D-anfoB) na redução do diâmetro da pata do camundongo infectado, mas influenciou favoravelmente na viabilidade e no número de células infectantes, mesmo aplicadas em intervalo de tempo maior, isto é, a cada 3 dias. A concentração final de D-anfoB e

D-anfoB-nano foram iguais, sugerindo que a D-anfoB-nano foi mais eficaz do que a terapia D-anfoB na diminuição da frequência da dose necessária para atingir o mesmo nível terapêutico, promovendo uma maior redução no número de parasitas (Figura 10) e na diminuição da viabilidade celular (Figura 11). O aumento do intervalo de tempo entre a aplicação de cada dose pode significar um avanço para o tratamento da LC, visto que o paciente não necessitaria ser hospitalizado para receber a medicação, o que poderia melhorar o índice de adesão ao tratamento.

Embora este trabalho não tenha avaliado os efeitos adversos, o tratamento com a D-anfoB-nano promoveu maior e significativa redução de parasitas no sítio da lesão, bem como maior diminuição da viabilidade celular. Além disso, a mesma concentração final, como pode ser observado no grupo D-anfoB-nano foi usada em intervalos maiores de tempo e não houve diferenças significativas nos resultados em 24 horas e 10 dias pós-tratamento, sustentando a hipótese que aquele tratamento é favorável ao intervalo maior entre as administrações. Isso vem de encontro com achados de Peixoto et al. (2008), que observou que a anfotericina B associada às nanoestruturas carreadoras provoca menos estresse aos camundongos, pois a liberação controlada, com a mesma dose, permite um maior intervalo de tempo entre as aplicações (97). Ainda de acordo com Peixoto e colaboradores (2008), o estudo infere, também, que houve redução dos efeitos adversos quando comparado com a anfotericina B desoxicolato (97).

A via de administração da D-anfoB é convencionalmente a via endovenosa, mas neste estudo com camundongos foi adotada a via intraperitoneal. No entanto, acredita-se que se a dose tivesse sido administrada por via intralésional, ou seja, diretamente na pata lesionada, as nanopartículas magnéticas poderiam estar mais concentradas na região lesionada e responder mais adequadamente quando expostas ao campo magnético, o que poderia ter favorecido a morte das *Leishmanias* pelo aumento de temperatura.

Os resultados encontrados neste trabalho têm também suporte nos testes realizados por Carneiro e colaboradores (2011) com citrato de ródio (II), antineoplásico, com atividade citostática e citotóxica para tumor de Ehrlich, carregadas por nanopartículas de maghemita ou magnetolipossomas, que mostraram maior citotoxicidade para as células de câncer de mama que as células normais (98).

Muitos agentes infecciosos são sensíveis ao calor e assim, por exemplo, a febre alta atua como mecanismo de defesa contra uma série de processos, principalmente relacionados com outras infecções, assim como ocorre durante a infecção pela malária em indivíduos co-infectados com leishmaniose. Portanto, poderíamos esperar uma melhor resposta terapêutica ao tratamento por magnetohipertermia, que visa eliminar o agente infeccioso, elevando a temperatura na região afetada, utilizando nanopartículas magnéticas submetidas a um campo magnético externo de frequência alternada. No entanto, isso não ocorreu como o esperado, possivelmente porque as nanopartículas magnéticas administradas no peritônio não tenham atingido a lesão em quantidade suficiente para dissipar calor e assim destruir as células infectadas. Outra motivo é que os camundongos foram expostos ao campo magnético por apenas 10 minutos (85), tempo que talvez não tenha sido suficiente para que as nanopartículas magnéticas atingissem a lesão nas condições necessárias para obter efeitos desejáveis da magnetohipertermia após a administração por via intraperitoneal. Estes aspectos devem ser investigados futuramente.

Por fim, a termoterapia para o tratamento da LC é um método já aceito pela OMS (2010) (98). No entanto, esta se difere da magnetohipertermia por ter ação leishmanicida através de uma ou duas aplicações de calor localizadas, a 50 ° C por 30 segundos, sendo esta técnica tão efetiva quanto o SB⁵⁺ intralesional (com taxa de cura de 70%) no Afeganistão para LC causada por *L. tropica* e mais efetiva (com taxa de cura 70%) do que SB⁵⁺ sistêmico para tratamento da leishmaniose cutânea principal. Essa técnica emprega um dispositivo caro, que funciona com uma bateria, e a evolução inicial da doença após a termoterapia é complicada devido às queimaduras de segundo grau, além de cada aplicação necessitar de anestésico.

Este estudo poderia ter adotado um grupo de tratamento apenas com essas nanopartículas magnéticas, sem a exposição do campo magnético produzido pela magnetohipertermia e dessa forma, seria possível inferir se o tratamento por magnetohipertermia tem influência na redução da lesão ou se a redução é decorrente somente da aplicação do fluido magnético.

Desse modo, espera-se que os próximos testes sejam realizados por período de tempo maior de exposição ao campo produzido pela magnetohipertermia, na perspectiva de obter resultados mais eficazes que as terapias tradicionais para a LC de modo que o tratamento possa possibilitar uma maior comodidade ao paciente,

sem a necessidade de hospitalização, e um menos efeitos tóxicos decorrentes da terapia por anfotericina B.

6 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, pode-se concluir que o tratamento de camundongos infectados com LC causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com a amostra de anfotericina B nanoestruturada (D-anfoB-nano) promoveu reduções maiores no número de parasitas e da viabilidade celular comparadas com a D-anfoB, além de requerer menor número de administrações da droga enquanto apresentando o mesmo nível terapêutico. Por sua vez, o tratamento efetuado pela amostra nanoestruturada magnética (D-anfoB-nano-MG) apresentou a mesma eficácia que o grupo tratado com D-anfoB, ou seja, ambas promoveram a redução da média dos diâmetros da pata de forma significativa.

Este trabalho visou contribuir para a melhoria do tratamento da LC a partir da associação dos efeitos terapêuticos da D-anfoB com os benefícios promissores das nanopartículas carreadoras. Portanto, estes resultados poderão ser utilizados por profissionais de saúde interessados nessa área, com a perspectiva de que sejam fonte de aprimoramento de novas técnicas futuras de tratamento da LC.

7 PERSPECTIVAS

Novos estudos deverão ser realizados no futuro na perspectiva de avaliar:

- A eficácia da D-anfoB-nano-MG por administração via intralesional para posterior aplicação da magnetohipertermia, pois acredita-se que uma concentração maior das nanopartículas magnéticas no local da lesão possa aumentar a temperatura e otimizar o efeito da magnetohipertermia.

- Os efeitos do aumento do tempo de exposição ao campo magnético de cada indivíduo a ser tratado por magnetohipertermia (adotar grupos com tempos de 10, 20 e 30 minutos) para o aumento da temperatura na região lesionada.

- Observar efeitos do tratamento com D-anfoB-nano contendo nanopartículas magnéticas à base de maghemita, sem contudo fazer a exposição ao campo magnético AC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tropical Diseases Lacking Adequate Control Measures: Dengue, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis [Internet]. [local desconhecido]: The World Bank Group. [acesso em 4 de agosto de 2011]. Disponível em: <http://www.dcp2.org/pubs/DCP/23/>
2. World Health Organization. Disease information: Leishmaniasis [Internet]. Geneva; Suíça. [Atualizada em 2010; acesso em 20 de julho de 2011]. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
3. Griekspoor A; Sondorp E; Vos T. Cost-Effectiveness Analysis of Humanitarian Relief Interventions: Visceral Leishmaniasis Treatment in the Sudan. *Health Policy Plan.* 1999;14(1):70-6.
4. Reithinger R; Coleman PG. Treating cutaneous leishmaniasis patients Kabul, Afghanistan: cost-effectiveness of an operational programme in a complex emergency setting. *BMC Infect Dis.* 2007 30; 7:3.
5. Arana BA; Mendoza CE; Rizzo NR; Kroeger A. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(5):466-70.
6. Guthmann JP; Arlt D; Garcia LM et al. Control of mucocutaneous leishmaniasis, a neglected disease: results of a control programme in Satipo Province, Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65 (5):466-70.
7. Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;15(1):68-76.

8. Gianotti N; Maillard M; Gaiera G; Bestetti A; Cernuschi M; De Bona A; Lazzarin A; Cinque P; Bossolasco S. Leishmania infection can hamper immune recovery in virologically suppressed HIV-infected patients. *New Microbiol.* 2008; 31(3):435-8.
9. Sereno D; Holzmuller P; Lemestre J.L. Efficacy of second line drugs on antimonyl- resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica.* 2000; 74: 25- 31.
10. Vouldoukis I; Rougier S; Dugas B; Pino P; Mazier D; Woehrlé F. Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol.* 2006; 135: 137-146.
11. Berman JD; Fioretti TB; Dwyer DM. In vivo and in vitro localization of leishmania within macrophage phagolysosomes: use of colloidal gold as a lysosomal label. *J Protozool.* 1981; 28(2):239-42.
12. Vyas SP, Gupta S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *Int J Nanomedicine.* 2006; 1(4):417-32.
13. Launois P; Tacchini-Cottier F; Kieny MP. Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine. *Expert Review of Vaccines.* 2008; 7 (8) :1277-1287.
14. Silva GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurol.*, 2004; 61:216-220.
15. Jain AK; Das M; Swarnakar NK; Jain S. Engineered PLGA nanoparticles: an emerging delivery tool in cancer therapeutics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2011; 28(1):1-45.
16. Moghimi SM; Hunter AC; Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 2005; 19(3):311-30.

17. Date AA; Joshi MD; Patravale VB. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(6):505-21.
18. Pimentel LF; Jácome AT; Mosqueira VCF; Magalhães NSS. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Rev Bras Cienc Farm.* 2007; 43 (4): 503-514.
19. Suri SS; Fenniri H; Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med Toxicol.* 2007; 2:1-16.
20. Gil ES; Cunha LC; Paula JR; Barreto JC; Aguiar FA. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. *Vita et Sanitas,* 2007; 1: 1-26.
21. Ramos CS; Yokoyama-Yasunaka JK; Guerra-Giraldez C; Price HP; Mortara RA; Smith DF; Uliana SR. Leishmania amazonensis META2 protein confers protection against heat shock and oxidative stress. *Exp Parasitol.* 2011;127 (1):228-37.
22. Altamirano-Enciso A J; Marzochi C A; Moreira J S; Schubach A O; Marzochi K BF. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *Hist cienc saude-Manguinhos.* 2003; 10(3): 853-882.
23. Camara Coelho LI; Paes M; Guerra JA; Barbosa MG; Coelho C; Lima B; Brito ME; Brandão Filho SP. Characterization of Leishmania spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res.* 2011;108(3):671-7.
24. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Vigilância Epidemiológica, Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. Manual de Controle da Leishmaniose Visceral Americana, Brasília, 2000.
25. Ministério da Saúde. Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e

- Unidades Federadas. [Atualizada em 2010; acesso em 19 de fevereiro de 2011]. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2_lta_deteccao_27_10_2010.pdf.
26. Goto H; Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* (2010). 8(4), 419–433.
27. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento e Vigilância da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. Fiocruz [Internet]. [Atualizada em 2007; acesso em 16 de fevereiro de 2011]. Disponível em <http://www4.ensp.fiocruz.br/Leishmaniose/situacao-da-lt-no-brasil/>
28. Coler RN; Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2005 ;21(5):244-9.
29. World Health Organization. Control of Neglected Tropical Diseases [Internet]. Geneva; Suíça. [Atualizada em 2010; acesso em 4 de agosto de 2011]. Disponível em http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_cutaneous_2009.png
30. Name RQ; Sampaio RNR. Case series study of mucocutaneous leishmaniasis (MCL): epidemiology and treatment. *An Bras Dermatol.* 2001; 76(1):51-62.
31. Gontijo B; Carvalho ML. R. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(1): 71-80.
32. Vieira-Goncalves R; Pirmez C; Jorge ME; Souza WJS; Oliveira MP; Rutowitsch MS; Da-Cruz AM. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol.* 2008; 47(9):926-932.
33. Silveira FT; Lainson R; De Castro Gomes CM; Laurenti MD; Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.)*

- amazonensis in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009; 31(8):423-31.
34. Felizardo TC;Toma LS;Borges NB;Lima GM;Abrahamsohn IA. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. *Parasitology.* 2007;134(Pt 12):1699-707.
35. Ota H;Takashima Y; Matsumoto Y; Hayashi Y;Matsumoto Y. Pretreatment of macrophages with the combination of IFN-gamma and IL-12 induces resistance to *Leishmania major* at the early phase of infection. *J Vet Med Sci.* 2008;70(6):589-93.
36. Balland O;Pinto-Alphandary H;Viron A; Puvion E;Andremont A;Couvreur P. Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* and treated with (3H)ampicillin-loaded nanoparticles. *J Antimicrob Chemother.* 1996;37(1):105-15.
37. Frézard F;Demicheli C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010; 7(12):1343-58. Epub 2010.
38. Sacks D; Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology* (2002), 2, 845–858. Sacks DL; Hieny SS, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *Journal of Immunology.* 1985; 135, 564–569.
39. Chang KP;Reed SG;McGwire BS;Soong L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.* 2003;85(3):375-90.
40. Murray HW; Berman JD; Davies CR & Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* ,2005; 366, 1561–1577.
41. de Souza MC, de Assis EA, Gomes RS, Marques da Silva Ede A, Melo MN, Fietto JL, Afonso LC. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania*

- amazonensis infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop.* 2010;115(3):262-9. Epub 2010; 24.
- 42.Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives.*Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27(5):305-18.
- 43.Desjeux P. et al. Leishmania/HIV co-infection in south-western Europe, 1990-1998, retrospective analysis of 965 cases, *World Health Organization*, 2000, 42:1-12. Date AA; Joshi M D; Patravale V B. Parasitic diseases:Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews.*2007;59:505–521.
- 44.Rath S; Trivelin LA; Imbrunito TR; Tomazela DM; Jesús MN; Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose; estado da arte. *Química nova.* 2003; 26(4): 550-555.
- 45.Soto J;Valda-Rodriguez L;Toledo J;Vera-Navarro L;Luz M;Monasterios-Torrico H;Vega J;Berman J.Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(5):577-81.
- 46.Chakravarty J; Sundar S. Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(2):167-76.
- 47.Zauli-Nascimento RC;Miguel DC; Yokoyama-Yasunaka JK; Pereira LI;Pelli de Oliveira MA;Ribeiro-Dias F;Dorta ML;Uliana . In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health.* 2010;15(1):68-76.
- 48.Frézard F;Demicheli C;Ribeiro RR.Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs.*Molecules.* 2009; 30;14(7):2317-36.
- 49.Minodier P; Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease.*2007; 5, 150–158

50. Sampaio RNR; Marsden PD. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B liposomal. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1997; 30 (2): 125-128.
51. Amato VS; Padilha ARS; Nicodemo A C; Duarte MIS; Valentini M; Uip DE; Boulos M; Amato VN. Use of Itraconazole in the Treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study. *International Journal of Infectious Diseases*; 2000, 4(3): 153-157.
52. Rocha LG; Almeida J R; Macedo R O; Barbosa-Filho JM . A review of natural products with antiLeishmanial activity. *Phytomedicine.* 2005; 12(6-7): 514-535.
53. Sampaio RNR; Porto C; Motta J. Estudo comparativo entre o tratamento com anfotericina B lipossomal e n-metil-glucamina na forma cutânea de Leishmaniose. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 37 (1): 223.
54. Demicheli C; Frézard F; Lecouvey M; Garnier-Suillerot, A. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2002; 1570: 192-198.
55. Kayser O, Olbrich C, Yardley V, Kiderlen AF, Croft SL. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Int J Pharm.* 2003; 254(1):73-5.
56. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV. Brasília, Brasil, 2011.
57. Villarreal M R. Leishmaniasis life cycle diagram en.svg [Internet]. Hamburgo, Alemanha. [Atualizada em 2009; acesso em 19 de fevereiro de 2011]. Disponível em http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg
58. Antoniadou A; Dupont B. Lipid formulations of amphotericin B: where are we today? *Journal de Mycologie Médicale.* 2005;15: 230–238.

59. Di Giorgio C; Faraut-Gambarelli F; Imbert A; Minodier P; Gasquet P; Dumon H. Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates from patients with visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 1999;44:71–6.
60. Kleinberg M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27S:S12–16.
61. Barratt G; Bretagne S. Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. *International Journal of Nanomedicine.* 2007, 2(3): 301–13.
62. Mazerski J; Bolard J; Borowski E. Self association of some polyene macrolide antibiotics in aqueous media. *Biochim Biophys Acta.* 1982; 719:11–17.
63. Yoo BK; Jalil Miah MA; Lee E-S; et al. Reduced renal toxicity of nanoparticulate amphotericin B micelles prepared with partially benzylated poly-L-aspartic acid. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29:1700–5.
64. Espuelas MS; Legrand P; Loiseau PM; Bories C; Barratt G; Irache JM. In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. *J Drug Target.* 2002; 10(8):593-9.
65. Meyerhoff A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1999; 28 : 42-8.
66. Croft SL; Coombs GH. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19 : 502-8.
67. Zhang D; Tan T; Gao L; Zhao W; Wang P. Preparation of azithromycin nanosuspensions by high pressure homogenization soluble drugs: a case study with risperidone. *Drug Dev Ind Pharm* 2007; 33(5):569-575.

68. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature*. 1998; 392:5–10.
69. Torres-Santos EC, Rodrigues JM Jr; Moreira DL; Kaplan MA; Rossi-Bergmann B. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(7):1776-8.
70. Torres-Santos EC; Moreira DL; Kaplan MA; Meirelles MN; Rossi-Bergmann B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(5):1234-41.
71. Amaral AC; Bocca AL; Ribeiro AM; Nunes J; Peixoto DL; Simioni AR; Primo FL; Lacava ZG; Bentes R; Titze-de-Almeida R; Tedesco AC; Morais PC; Felipe MS. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63: 526–533.
72. Shikanai-Yasuda MA; Telles Filho FQ; Pôncio-Mendes R; Lopes Colombo A; Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006; 39 (3): 297-310.
73. Shukla J; Bandopadhyaya GP; Varma IK; Kumar R; Maulik SK. Morphology and release kinetics of technetium-99m(V) dimercaptosuccinic acid loaded, poly(lactic-co-glycolic) acid microspheric delivery system. An experimental approach that may be used for targeted radiation treatment. *Hell J Nucl Med* 2007; 10(1): 9-13.
74. Corrêa FAP. Avaliação da Biocompatibilidade de Fluido Magnético à Base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos [dissertação]. Mestrado em Patologia Molecular – Universidade de Brasília: Brasília, 2008
75. Araki K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. *Química Nova*. 2007; 30 (6):1484-1490.

76. Lee C; Huang KT; Wei PK; Yao YD. Conjugation of γ Fe₂O₃ nanoparticles with single strand oligonucleotides. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2006; 304(1): 412-414.
77. Lavava LM; Garcia VAP; Kuckelhaus SA; Azevedo RB; Lacava ZGM; Silva O; Pelegrini F; Gansau C; Buske N; Morais PC. Magnetic resonance and light microscopy of a dextran coated magnetic fluid. *Journal of Applied Physics*. 2003; 93 (10): 7563-7565,.
78. Sadeghiani N; BARBOSA LS; SILVA LP; AZEVEDO RB; MORAIS PC; LAVACA ZGM. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface-coated with polyaspartic acid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005; 289: 266-468.
79. Castro VF; Juliana C, Alvaro AA Q; Filiberto GG. Propriedades magnéticas e biocompatíveis de nanocompósitos para utilização em magneto-hipertermia. *Revista Brasileira de Física Médica*. 2010;4(1):79-82.
80. Ito A; Shinkai M; Honda H; Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng*. 2005; 100(1):1-11.
81. Chorilli M; Michelin DC; Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2007; 28(1): 11-23.
82. Mc Mahon-Pratt D; Alexander J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunology Reviews*. 2004; 201: 206–224.
83. Lemos de Souza V, Ascensão Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues de-Freitas LA. Different Leishmania species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect*. 2000;2(15):1807-15.
84. Costa Filho AV, Lucas IC, Sampaio RNR. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por Leishmania (Leishmania) amazonensis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41: 424-427.

85. Portilho FA; Estevanato LLC; Miranda-Vilela AL; Almeida-Santos MFM; Oliveira-Cavalcanti CE; Lacava BM; Simioni AR; Tedesco AC; Morais PC; Lacava ZGM. Investigation of a magnetohyperthermia system efficacy. *J Appl Phys* 2011; 109: 07B307.
86. Titus RG; Marchand M; Boon T; Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* 1985; 7: 545-555.
87. Taswell C. Limiting dilution assays for the separation, characterization, and quantitation biologically active particles and their clonal progeny. In: *Cell Separation: Methods and Selected Applications*, Vol. 4 (T.G. Pretlow and T.P. Pretlow, Eds), pp. 109-145. Academic Press, London.
88. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.
89. Moreira RCR; et al. efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (rich.) Vahl (Verbenaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17(1):59-63
90. Lima AP; Pereira FC; Vilanova-Costa C; Ribeiro ASBB; Silveira-Lacerda EP. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis*. *Rev Eletronica Farm. Suplemento.* 2006; 3(2): 10-12, 2006.
91. Valadares MC; Castro NC de; Cunha LC da. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev Bras Cienc Farm.* 2007; 43(4): 631-638.
92. Lima HC; Bleyenbergh JA; Titus RG. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol Today.* 1997; 13(2):80-2.
93. Sampaio RNR; Rocha RAA; Marsden PD; Cuba CC; Barreto AC. Leishmaniose tegumentar americana-Casuística do Hospital Escola da UnB. *An Bras Dermatol.* 1980; 55(2):69-76

94. Franck X; Fournet A; Prina E; Mahieux R; Hocquemiller R; Figadère B. Biological evaluation of substituted quinolines. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14(14):3635-8.
95. Raychaudhury B; Banerjee S; Gupta S, Singh RV, Datta SC. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. *Acta Tropica*. 2005; 95: 1-8.
96. Ridley RG "Product R&D for neglected diseases: 27 years of TDR experiences with public-private partnerships." *EMBO Rep*. 2003; 4, Spec No: S43-46.
97. Peixoto DLG. Avaliação da biocompatibilidade da anfotericina b em duas formulações livre e associada com nanopartículas magnéticas. [dissertação]. Mestrado em Patologia Molecular – Universidade de Brasília: Brasília, 2008.
98. Carneiro ML; Nunes ES; Peixoto RC; Oliveira RG; Lourenço LH; C; Simioni AR; Tedesco AC; de Souza AR; Lacava ZG, Bão SN. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. *J Nanobiotechnology*. 2011; 28;9:11.

ANEXO A - TESTE DE NORMALIDADE DOS DADOS DAS MEDIDAS DO PAQUÍMETRO

Tests of Normality^a

grupo		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
antes infecção	Leishmania	,333	6	,036	,873	6	,238
	não tratado	,287	5	,200*	,869	5	,261
	anfo B	,233	5	,200*	,860	5	,227
	anfo B NANO	,204	5	,200*	,937	5	,645
	anfo B NANO M	,216	5	,200*	,924	5	,554
antes tratament	Leishmania	,263	6	,200*	,823	6	,093
	não tratado	,193	5	,200*	,941	5	,670
	anfo B	,220	5	,200*	,873	5	,279
	anfo B NANO	,237	5	,200*	,902	5	,419
	anfo B NANO M	,227	5	,200*	,944	5	,696
24 h	Leishmania	,307	6	,080	,827	6	,102
	não tratado	,154	5	,200*	,976	5	,911
	anfo B	,232	5	,200*	,944	5	,698
	anfo B NANO	,284	5	,200*	,933	5	,616
	anfo B NANO M	,340	5	,060	,815	5	,106
10 dias	Leishmania	,307	6	,080	,827	6	,102
	não tratado	,229	5	,200*	,957	5	,788
	anfo B	,249	5	,200*	,923	5	,551
	anfo B NANO	,154	5	,200*	,994	5	,992
	anfo B NANO M	,279	5	,200*	,917	5	,513

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

ANEXO B - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS DAS MEDIDAS DO PAQUÍMETRO

Estatística Descritiva

	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	IC 95%		Mínimo	Máximo	
					Limite Inferior	Limite superior			
antes infecç	Leishmania	6	2,5000	,04183	,01708	2,4561	2,5439	2,45	2,58
	não tratado	5	2,5220	,24793	,11088	2,2142	2,8298	2,30	2,93
	anfo B	5	2,5860	,11824	,05288	2,4392	2,7328	2,45	2,70
	anfo B NANC	5	2,5320	,06834	,03056	2,4471	2,6169	2,43	2,60
	anfo B NANC	5	2,5520	,09524	,04259	2,4337	2,6703	2,40	2,65
	Total	26	2,5369	,12460	,02444	2,4866	2,5872	2,30	2,93
antes tratam	Leishmania	6	2,6667	,68313	,27889	1,9498	3,3836	2,00	3,50
	não tratado	5	4,7660	,36439	,16296	4,3136	5,2184	4,40	5,30
	anfo B	5	5,1100	,39275	,17564	4,6223	5,5977	4,65	5,50
	anfo B NANC	5	5,2220	,20487	,09162	4,9676	5,4764	5,03	5,55
	anfo B NANC	5	5,1300	,43675	,19532	4,5877	5,6723	4,45	5,60
	Total	26	4,5054	1,12042	,21973	4,0528	4,9579	2,00	5,60
24 h	Leishmania	6	2,9667	,30768	,12561	2,6438	3,2896	2,70	3,40
	não tratado	5	3,9280	,25898	,11582	3,6064	4,2496	3,63	4,28
	anfo B	5	3,5020	,37825	,16916	3,0323	3,9717	2,95	3,90
	anfo B NANC	5	3,5460	,09915	,04434	3,4229	3,6691	3,43	3,70
	anfo B NANC	5	3,7400	,37316	,16688	3,2767	4,2033	3,45	4,30
	Total	26	3,5146	,43936	,08616	3,3372	3,6921	2,70	4,30
10 dias	Leishmania	6	2,9667	,30768	,12561	2,6438	3,2896	2,70	3,40
	não tratado	5	4,2460	,40599	,18157	3,7419	4,7501	3,65	4,70
	anfo B	5	3,9060	,24583	,10994	3,6008	4,2112	3,53	4,15
	anfo B NANC	5	3,6900	,24083	,10770	3,3910	3,9890	3,35	4,00
	anfo B NANC	5	3,7760	,45512	,20353	3,2109	4,3411	3,25	4,50
	Total	26	3,6881	,54369	,10663	3,4685	3,9077	2,70	4,70

ANEXO C– ANÁLISE DO TESTE DE NORMALIDADE DA VIABILIDADE CELULAR

Teste de Normalidade

GRUPO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VIAVEIS% 1	,149	6	,200*	,985	6	,974
2	,155	6	,200*	,961	6	,830
3	,140	6	,200*	,982	6	,959
4	,157	6	,200*	,971	6	,902

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction



ANEXO D – ANÁLISE DESCRITIVA DA VIABILIDADE CELULAR

Estatística Descritiva

	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	IC 95%	Mínimo	Máximo	
					Limite Inferior	Limite Superior		
Grupo 1 ¹	6	108,238	12,114	4,945	95,525	120,950	90,805	25,223
D-AnfoB	6	58,812	8,591	3,507	49,797	67,828	48,531	1,073
D-Anfo B Nano	6	31,226	10,186	4,158	20,536	41,916	18,391	7,126
D- Anfo B Nano + magno	6	82,918	31,881	13,015	49,461	116,375	45,019	30,843
Total	24	70,299	33,781	6,896	56,034	84,563	18,391	30,843

VIAVEIS%

ANEXO E- COMPROVANTE DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

 <p>Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal</p>
<p>Brasília, 3 de agosto de 2010.</p>
<p>DECLARAÇÃO</p>
<p>Declaramos que o projeto intitulado "Estudo In Vivo da Ação Leishmanicida da Substância Anfotericina B Associada às Nanopartículas DMSA e PLGA no Tratamento da Leishmaniose", UnBDOC nº. 62393/2010, sob responsabilidade do Prof(a). Dr(a). Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.</p>
<p> Prof. Antonio Sebben Coordenador do CEUA</p> 