

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA E FISIOTERAPIA**  
**CURSO DE FISIOTERAPIA**

**Larissa Costa Rogério**

**Letícia Queiroz Machado**

**EFICÁCIA *IN VITRO* DE LIPOSSOMAS FURTIVOS CONTENDO  
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA E MILTEFOSINA PARA O  
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

**UBERLÂNDIA**  
**2017**

**Larissa Costa Rogério**

**Letícia Queiroz Machado**

**EFICÁCIA *IN VITRO* DE LIPOSSOMAS FURTIVOS CONTENDO  
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA E MILTEFOSINA PARA O  
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Fisioterapia da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Bacharel em Fisioterapia.

**Orientador: Prof. Dr. Sydney Magno da  
Silva**

**UBERLÂNDIA**

**2017**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e aos nossos guias espirituais por entenderem que esta graduação faz parte de nossa missão assim como este trabalho faz parte dos obstáculos a serem vencidos.

À Universidade Federal de Uberlândia, Universidade Federal de Minas Gerais e a seus corpos docentes excelentes que possibilitaram direta ou indiretamente a execução deste trabalho.

Ao nosso orientador Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva, que esteve presente em todos os momentos desde o início da graduação e foi essencial para nossa formação ética e profissional.

Aos nossos pais e familiares que deram suporte absoluto em todos os momentos de nossas vidas.

E a todos que contribuíram com palavras amigas, gestos bondosos ou duras críticas.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) constitui um sério problema de saúde pública e apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. Por apresentar caráter zoonótico que envolve primariamente reservatórios e vetores silvestres seu controle torna-se difícil. A principal medida de controle da LTA no homem continua sendo a quimioterapia, principalmente com derivados do antimônio pentavalente ( $Sb^{5+}$ ) que, entretanto, pode causar toxicidade e diversos efeitos colaterais. Em razão disso, novas abordagens farmacológicas, como as baseadas em drogas leishmanicidas em formulações de lipossomas de circulação prolongada (lipossomas peguilados ou furtivos) têm sido sugeridas a fim de aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos secundários deletérios. O objetivo deste trabalho foi preparar caracterizar e avaliar, *in vitro*, a eficácia terapêutica do antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de ação prolongada contendo miltefosina para o tratamento da LTA. Lipossomas peguilados contendo miltefosina (HePC-PEG) foram preparados utilizando o método "desidratação e reidratação de vesículas", ou DRV, em água a partir de miltefosina (HePC) e dos lipídeos colesterol, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 e dicetilfosfato. Os lipossomas peguilados contendo miltefosina e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM), foram obtidos pela reidratação das vesículas de HePC-PEG com solução aquosa de antimoniato de meglumina (AM). A caracterização das vesículas (diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (Z) das formulações lipossomais foi determinada por espectroscopia de correlação de fótons e a taxa de encapsulação de Sb por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite. Os ensaios de concentração citotóxica 50% ( $CC_{50}$ ) e atividade leishmanicida das formulações concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) foram realizados em macrófagos murinos, utilizando o método colorimétrico MTT, e em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, utilizando o método colorimétrico de redução da resazurina, respectivamente. Foi avaliada, ainda, a eficácia da formulação contra amastigotas intracelulares 24h, 48h, e 72h após o tratamento. A formulação HePC-PEG/AM teve diâmetro hidrodinâmico médio de 200,85nm,  $IP=0,074$  e  $Z= -66mV$ , compatíveis com um sistema nanoestruturado estável e monodisperso. HePC-PEG/AM apresentou  $CC_{50}$  igual a 103,21 $\mu g/mL$ , taxa maior que a miltefosina em sua forma livre (41,59 $\mu g/mL$ ) sugerindo menor toxicidade celular da droga em formulação lipossomal. O valor de  $CI_{50}$  para HePC-PEG/AM foi igual a 28,34  $\mu g/mL$ , enquanto para miltefosina livre o  $CI_{50}$  teve o valor de 49,59  $\mu g/mL$ . Nos ensaios contra amastigotas intracelulares, a formulação peguilada reduziu significativamente as taxas de infecção dos macrófagos em relação a AM e miltefosina, 72h após o tratamento, e em relação ao controle sem infecção em todos os tempos avaliados. Em conclusão, a formulação HePC-PEG/AM apresentou características de tamanho reduzido das vesículas, estabilidade elétrica e monodispersão, além de proporcionar significativa redução das taxas de infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis*, *in vitro*, sendo esta maior do que a proporcionada pelas drogas na sua forma livre indicando efeito sinérgico entre os fármacos encapsulados.

**Palavras chave:** Lipossomas furtivos, antimoniato de meglumina, miltefosina, leishmaniose tegumentar.

## ABSTRACT

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a serious health problem worldwide distributed with case notified in all Brazilian regions. ATL is a zoonosis that involves primarily wild reservoirs and vectors which turns difficult the control of the disease. Despite of its limitations treatment still remains as main control measure for all clinical forms of leishmaniasis, including ATL. Even though the use of pentavalent antimonials ( $Sb^{5+}$ ) presents several limitations, these compounds are still the first-line drugs for the treatment of ATL, however, they can cause toxicity leading to important side effects. Because of this, a novel pharmacological approach based on leishmanicidal drugs in stealth liposome formulations have been suggested in order to increase the therapeutic efficacy and reduce side effects of these conventional drugs. The aim of this work was to prepare, characterize and evaluate, *in vitro*, the therapeutic efficacy of meglumine antimoniate encapsulated in stealth liposomes containing miltefosine for the treatment of cutaneous leishmaniasis. Stealth liposome containing miltefosine (HePC-PEG) was prepared using the "dehydration and rehydration vesicles" method (DRV) in water using miltefosine (HePC), cholesterol, dipalmitoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000 and diethylphosphate. The stealth liposome containing miltefosine and meglumine antimoniate (HePC-PEG/AM) was obtained by rehydration of HePC-PEG vesicles with an aqueous solution of meglumine antimoniate. The vesicle characterization (hydrodynamic diameter, polydispersity index (PI) and zeta potential (Z)) of the formulations was determined by photon correlation spectroscopy and the Sb encapsulation rate by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. The cytotoxicity ( $CC_{50}$ ) and leishmanicidal activity of the formulations ( $IC_{50}$ ) were performed in murine macrophages, using the MTT colorimetric method, and in promastigote forms of *Leishmania amazonensis*, using the colorimetric method of resazurin reduction, respectively. The efficacy of the formulation against intracellular amastigotes at 24h, 48h, and 72h after treatment was also evaluated. The HePC-PEG/AM formulation presented a hydrodynamic diameter of 200.85nm, PI= 0.074 and z= -66mV. HePC-PEG/AM presented  $CC_{50}=103.21\mu\text{g/mL}$ , a higher rate than the  $CC_{50}$  obtained by the non-encapsulated miltefosine ( $41.59\mu\text{g/mL}$ ) suggesting lower cellular toxicity of the drug in liposomal formulation. The  $IC_{50}$  value for HePC-PEG/AM was  $28.34\mu\text{g/mL}$  whereas the non-encapsulated miltefosine the  $IC_{50}$  was  $49.59\mu\text{g/mL}$ . In the intracellular amastigote assays, the stealth formulation significantly reduced macrophage infection rates when compared to AM and miltefosine, 72h after treatment and to non treated control at all times evaluated. In conclusion, the HePC-PEG/AM formulation showed small hydrodynamic vesicle size, electrical stability and monodispersion, as well as providing significant reduction in the rates of macrophage infection by *Leishmania amazonensis*, *in vitro*, which was greater than the rates obtained by the conventional drugs suggesting synergy/addictive effect between these drugs when encapsulated in stealth liposomes.

**Key words:** Stealth Liposomes, meglumine antimoniate, miltefosine, tegumentary leishmaniasis.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos lipossomas peguilados contendo miltefosina e antimoniato de meglumina ( HePC-PEG/AM).....	23
Tabela 2 - Valores de CC <sub>50</sub> determinados para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e valores de CI <sub>50</sub> determinados para formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> MHOM/BR/1989/BA199 após incubação por 72 horas com formulações testadas. ....	25

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Curva de crescimento de *Leishmania amazonensis* CEPA MHOM/BR/1989/BA199 em meio a cultura quimicamente definida Alfa-MEM. Cada ponto representa a média das contagens diárias. As setas indicam o início da fase exponencial (3° dia), estacionária inicial (5° dia) e estacionária tardia (6° dia).....21
- Figura 2 - Imagem representativa da caracterização da formulação HePC-PEG/AM) por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o aparelho Zetasizer Nano ZS90. O gráfico mostra o diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas e o índice de polidispersão da formulação.....23
- Figura 3 - Ensaio de eficácia de formulação lipossomal de circulação prolongada contendo antimoniato de meglumina e miltefosina (HePC-PEG/AM) (~200 nm) contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis cepa* MHOM/BR/1989/BA199 em macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c. Barra azul→HePC=10 µM; Barra cinza→AM = 150 µg/mL que corresponde a 40 µg/mL de Sb; Barra branca→ HePC-PEG/AM→Sb (16 µg/mL) + HePC (10 µM); Barra preta→ Controle = macrófagos infectados sem tratamento;\*\*\*p<0,001; #p<0,005; Two-way ANOVA, pós – teste Bonferroni. Figura representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. ....26

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
3.1	CULTIVO E MANUTENÇÃO DE <i>Leishmania amazonensis</i> PARA ENSAIOS DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA.....	13
3.2	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE AÇÃO PROLONGADA CONTENDO MILTEFOSINA (HEPC-PEG/AM).....	14
3.2.1	ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (AM) .....	14
3.2.2	LIPOSSOMAS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO MILTEFOSINA E AM (HEPC-PEG/AM).....	14
<b>4</b>	<b>ANIMAIS .....</b>	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>17</b>
5.1	EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES SOBRE A VIABILIDADE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> .....	17
5.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE HEPC-PEG/AM SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS .....	18
5.3	ENSAIOS DE EFICÁCIA CONTRA AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>Leishmania amazonensis</i> .....	19
<b>6</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>
	<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>32</b>

# 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar constitui um sério problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos e, junto com a leishmaniose visceral, é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas no mundo (OMS, 2017). No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete pele e mucosas, causada por protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, que são transmitidos ao homem e animais pela picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) do gênero *Lutzomyia*. As principais espécies causadoras de LTA são *Leishmania (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (LAINSON E SHAW, 2005). Primariamente, a LTA é uma zoonose, sendo que os reservatórios do parasito são mamíferos silvestres e o homem pode ser envolvido secundariamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, usualmente divididas em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutaneomucosa (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (SILVEIRA et al., 2004). A LTA é uma das afecções dermatológicas que merecem mais atenção, pelo risco de desenvolvimento de deformidades transitórias ou permanentes no ser humano, e por seu caráter estigmatizante, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (OMS, 2017), tem ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras, sendo considerada endêmica nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste, com média de 21.161 casos notificados entre os anos 2010-2015. Os Estados do Pará, Bahia e Mato Grosso, respectivamente, foram os líderes em notificação de casos no período. Minas Gerais apresentou, em média, 1403 casos/ano, já o município de Uberlândia tem notificado, em média, 10 casos autóctones /ano (SINAN/SVS/MS, 2017).

Segundo a OMS, a principal medida de controle da LTA no homem continua sendo a quimioterapia, principalmente com derivados do antimônio pentavalente ( $Sb^{5+}$ ) (OMS, 2010). O antimoniato de meglumina (AM) (Glucantime®, Rhodia) é o derivado de  $Sb^{5+}$  utilizado no

Brasil, devido a sua baixa absorção oral e seu elevado clearance plasmático, este composto é administrado diariamente por via parenteral, por um período longo de 20 a 40 dias, além disso, apresenta graves efeitos colaterais como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Como resultado do uso indiscriminado do AM por mais de 70 anos, tem sido relatado o aparecimento de linhagens resistentes ao fármaco, com pacientes não responsivos ao tratamento (FREZARD et al., 2005; OMS, 2010). Devido a isto, pesquisas estão sendo realizadas no intuito de elaborar novas formulações que auxiliem no avanço dos tratamentos já empregados. Um exemplo desse progresso é a aplicação de lipossomas como sistema carreador de fármacos. A vantagem dos lipossomas em relação a outros sistemas carreadores de medicamento é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando estes são formados de lipídeos pertencentes às famílias de lipídeos naturais (FRÉZARD et al., 2005).

Dentre as possibilidades de uso dos lipossomas no tratamento de leishmanioses, considera-se uma nova abordagem terapêutica baseada no uso da miltefosina, associada com o antimoniato de meglumina; estes fármacos quando combinados em solução podem apresentar efeito sinérgico e promissor demonstrando melhores resultados que as drogas livres (SEIFERT e CROFT, 2006; PAPAGIANNAROS et al., 2005). Por essa razão, o projeto propõe a combinação destes fármacos em uma formulação lipossomal de circulação prolongada ou furtiva, que possui na sua composição um polímero de etileno glicol (PEG) capaz de promover melhor aporte do fármaco por tempo prolongado nos sítios da infecção, maior eficácia em pacientes refratários à terapia convencional, menos efeitos colaterais, menor tempo de tratamento e baixa toxicidade. Esperamos que os nossos resultados forneçam subsídios que permitam propor testes de eficácia, *in vivo*, em outros modelos de LTA como camundongos, hamsters, cães e primatas não humanos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Estabelecer e padronizar a rotina do cultivo de *Leishmania amazonensis* para ensaios de eficácia terapêutica no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*/ Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM/UFU).

- Preparar e caracterizar formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de ação prolongada contendo miltefosina

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, *in vitro*, a eficácia terapêutica do antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de ação prolongada contendo miltefosina para o tratamento da LTA.

- Avaliar a citotoxicidade e eficácia dessa formulação em testes *in vitro*.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE *Leishmania amazonensis* PARA ENSAIOS DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA

Nos ensaios conduzidos nesse projeto utilizamos a cepa *Leishmania amazonensis* cepa (MHOM/BR/1989/BA199). Os parasitos foram obtidos do criobanco de cepas de *Leishmania* do Laboratório de Biologia de *Leishmania* - Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) e foram mantidos em cultura no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*-Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM/UFU).

Inicialmente, uma alíquota ( $1 \times 10^6$  promastigotas/mL) de meio contendo os parasitos criopreservados foi descongelada e semeada em meio  $\alpha$ -MEM completo ( $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM L-glutamina, 1000U/mL de penicilina e 100 $\mu$ g/mL de estreptomicina, 1% v/v BME vitaminas) e incubadas em estufa BOD (Demanda Biológica de Oxigênio), a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  em garrafas plásticas de cultura celular de 25cm<sup>2</sup> por sete dias.

A título da avaliação do desenvolvimento e multiplicação das formas promastigotas de *L. amazonensis* através da curva de crescimento analisou a cada 24 horas alíquotas das culturas nos quais foram diluídas em solução fixadora de ISOTON (ácido cítrico 0,05M, NaCl 0,12M, formaldeído 0,5%, pH 7,2). Com o auxílio de microscópio ótico em aumento 40X, os parasitos foram avaliados quanto à viabilidade, morfologia, motilidade e quantificados em câmara hemocitométrica de Neubauer. Foram realizadas duas contagens, e o número de parasitos contidos em 1 ml de meio foi dado pela seguinte fórmula:

*Número de parasitos*

= média dos quatro quadrantes maiores da câmara  $\times$  inverso da diluição da amostra  $\times 10^4$

A concentração de parasitos foi ajustada de acordo com a necessidade de cada teste. Alíquotas das culturas foram transferidas para criotubos e criopreservadas em nitrogênio líquido para ensaios futuros.

### 3.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE AÇÃO PROLONGADA CONTENDO MILTEFOSINA

#### 3.2.1 ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (AM)

A síntese do AM foi realizada no Laboratório de Biofísica dos Sistemas Nanoestruturados da Universidade Federal de Minas Gerais– LabNano/UFMG, de acordo com metodologia proposta por DEMICHELI et al. (2003), utilizando quantidades equimolares de N-metil-D-glucamina e pentacloreto de antimônio. O composto obtido foi caracterizado quimicamente como AM com teor de Sb de 28% m/m, determinado por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite no LabNano/UFMG.

#### 3.2.2 LIPOSSOMAS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO MILTEFOSINA E AM (HEPC-PEG/AM)

A produção dos lipossomas foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados - LabNano (UFMG), de acordo com metodologia descrita por SCHETTINI et al. (2006) e FRÉZARD et al. (2012) com modificações. O HePC-PEG/AM foi sintetizado e caracterizado com êxito.

Inicialmente o AM foi preparado a partir da reação entre N-metil-D-glucamina e  $SbCl_5$ , e o composto foi caracterizado quimicamente como antimoniato de meglumina e o teor de Sb (28% m/m) determinado por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite.

A metodologia de “Desidratação e Reidratação de Vesículas” ou DRV (Deydration Rehydration vesicles) foi utilizada para o preparo das vesículas HePC-PEG/AM. Lipossomas foram preparados em água a partir de miltefosina (HePC), colesterol (CHOL), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG2000) e dicetilfosfato (DCP) e o clorofórmio como solvente. A razão molar utilizada para o preparo da formulação foi 0,4:0,6:0,8:0,2:0,1 para HePC:DPPC:CHOL:DCP:DSPE-PEG 2000 em concentração final de lipídeos de 55g/L. Inicialmente foi formado o “filme lipídico” solubilizando os lipídios em clorofórmio (CH<sub>3</sub>Cl)/formaldeído (CH<sub>2</sub>O) em rotaevaporador com vácuo, para a completa evaporação do solvente. Este processo gerou fino filme lipídico composto por vesículas multilamelares (*MLVs - Multilamellar vesicles*), que foi hidratado com água Milli-Q®. Em seguida essa suspensão foi submetida à extrusão em membrana de policarbonato (100nm) para obtenção de vesículas unilamelares pequenas (*SUVs*). Adicionou-se sacarose como agente crioprotetor, seguido de congelamento e liofilização por 72h. O liofilizado foi reidratado com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Posteriormente foi realizado a reidratação com solução aquosa de AM (Sb<sup>5+</sup> a 32g/L) a 65°C. No final do processo a suspensão foi submetida à extrusão afim de forçar a passagem das vesículas com um diâmetro hidrodinâmico médio entre 150-250nm e ultracentrifugação, a fim de separar o AM não encapsulado. Após, o sedimento foi ressuspendido em PBS estéril e a suspensão de lipossomas foi armazenada a 4°C até o uso.

Alíquotas da suspensão final foram utilizadas para determinação das principais características visando diâmetro hidrodinâmico (~200nm), índice de polidispersão inferior a 0,3 e potencial zeta da amostra por meio de espectroscopia de correlação de fótons. Além da caracterização das vesículas, a eficiência de encapsulação do Sb foi determinada por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite.

O processo de preparo e caracterização dos lipossomas furtivos contendo HePC e AM foi protegido por pedido de depósito de patente junto ao INPI, intitulada "Formulação Lipossomal para o Tratamento das Leishmanioses" sob o numero: BR 10 2017 002582 9.

## **4 ANIMAIS**

Todos os procedimentos de manipulação dos animais estão de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da UFU - CEUA/UFU (ANEXO 1). Camundongos BALB/c machos, de 6 a 8 semanas de idade, foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal - CBEA/UFU, sob condições adequadas de manejo técnico, de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Medicina Veterinária, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, e Principles of Laboratory Animal Care – NIH/EUA.

## 5 ENSAIOS *IN VITRO*

### 5.1 EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES SOBRE A VIABILIDADE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* propostos nesse projeto foram realizados no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*/Parasitologia do ICBIM/UFU. A concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) das formulações para promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliada por meio do ensaio de viabilidade celular à base de resazurina (CORRAL et al., 2013).

Promastigotas em fase logarítmica de crescimento (2,5 x10<sup>5</sup> parasitos/poço) foram semeadas em placas de cultura celular de 96 poços em meio RPMI 1640 completo (meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 2mM L-glutamina, 1000U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina) e incubadas a 26°C com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A formulação HePC-PEG/AM, e a miltefosina comercial, foram diluídas de forma seriada, na razão 2, em meio RPMI 1640 completo nas concentrações de 160µg/mL até 2,5µg/mL, baseado na concentração de miltefosina nas formulações.

O AM livre foi diluído de forma seriada, na razão 2, em meio RPMI 1640 completo entre 400µg/mL a 12,5µg/mL. Parasitos não tratados foram utilizados para comparação da viabilidade. A formulação foi então incubada durante 72h. Após incubação foi adicionada solução de resazurina (0,15mg/mL em PBS) na relação de 10% v/v nos poços, e as placas foram incubadas durante 4h a 26°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando os seguintes comprimentos de ondas: 550 nm de excitação e 590 nm de emissão. A intensidade de fluorescência foi expressa em unidades arbitrárias e utilizada para o cálculo da viabilidade celular. Foram realizados três experimentos independentes, com as amostras testadas em triplicata. A concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da intensidade de fluorescência em relação ao controle (parasitos incubados com meio RPMI 1640 completo, considerado 100% de viabilidade), calculada por análise de regressão.

## 5.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE HEPC-PEG/AM SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS

Os macrófagos foram obtidos por injeção intraperitoneal de 2 mL de tioglicolato 3% em camundongos BALB/c. Após 72 horas, os camundongos foram eutanasiados e a cavidade peritoneal lavada com meio RPMI 1640 gelado. O lavado peritoneal foi centrifugado (3000 x g, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspensionado em meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% SFB, estreptomicina (50µg/mL) e penicilina (1000U/mL)). As células foram quantificadas em câmara de Neubauer com o auxílio do corante vital azul de tripan. Após ajuste de concentração para  $5 \times 10^5$  macrófagos/poço em meio RPMI 1640 completo, as células foram incubadas em placa de 96 poços a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas, para aderência dos macrófagos aos poços, por fim os poços foram lavados três vezes com meio RPMI 1640, para remover células não aderidas (TEMPONE et al., 2004).

Após lavagem e esgotamento dos poços, os macrófagos aderidos à placa foram incubados na presença da formulação de HePC-PEG/AM em concentrações correspondentes a 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100µg/mL de Sb diluídas em um volume final de 100µL de meio RPMI 1640 completo. Como controles do experimento, macrófagos foram incubados na presença apenas de meio RPMI 1640 completo, e com a droga livre nas mesmas concentrações citadas. Os macrófagos permaneceram expostos às drogas durante 24, 48 e 72 horas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após esse período, foram adicionados aos poços solução de MTT (brometo de [3(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium]), que interage somente com as células viáveis presentes no meio de cultura, e as placas foram novamente incubadas por 4 horas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após a incubação, o sobrenadante foi removido e adicionado 100µL de DMSO, para solubilizar os cristais de formazan gerados, as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (570nm) para determinação da absorbância correspondente a cada amostra (MOSMAN, 1983; TEMPONE et al., 2004).

Cada experimento foi repetido três vezes, e a densidade ótica final foi dada pelo valor da média  $\pm$  desvio padrão das leituras das amostras, realizadas em triplicata nas placas, subtraído do valor médio da densidade ótica dos poços contendo somente macrófagos. A

concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de MTT, calculada por análise de regressão.

### 5.3 ENSAIOS DE EFICÁCIA CONTRA AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *Leishmania amazonensis*

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram incubados em placas de 24 poços a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> na concentração de 5x10<sup>5</sup> macrófagos/poço. Culturas de promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária de crescimento foram ressuspensas em meio RPMI 1640 completo, com a concentração ajustada para 5x10<sup>6</sup> células/1000µL. Os parasitos foram colocados para interagir com macrófagos murinos, previamente incubados (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 4 horas), em placas de 24 poços, contendo uma lamínula estéril/poço, em formato circular na proporção de 10 promastigotas/macrófago/poço. As placas foram novamente incubadas por 4 horas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) e os poços lavados com meio RPMI 1640 completo, aquecido a 37°C, para remoção de promastigotas não fagocitadas e células não aderidas (ESLAMI e TANNER, 1994). A formulação de HePC-PEG/AM e as drogas livres foram diluídas em meio RPMI 1640 completo e testadas em quatro diluições seriadas baseadas na concentração de miltefosina na formulação, e respeitando os valores de citotoxicidade obtidos previamente. Os macrófagos infectados foram incubados por 24, 48 e 72 horas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) com a formulação e os fármacos livres. Como controles do experimento macrófagos infectados foram incubados somente com meio, e macrófagos não infectados com a formulação e fármacos livres. A seguir, as lamínulas foram retiradas dos poços, coradas por panótico rápido, montadas em lâminas com o auxílio de bálsamo do Canadá, e analisadas em microscópio ótico com objetiva de imersão. Foi determinada a taxa de infecção dos macrófagos (número de macrófagos infectados/número de não infectados, após contagem de 300 macrófagos por lamínula, em triplicata) para a formulação e as drogas livres, que foram comparadas com a taxa de infecção do controle sem as drogas (100% de infecção).

## **6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados dos testes foram submetidos à análise estatística com o auxílio dos programas de pacotes estatísticos GraphPad® InStat 5 (GraphPad Software Inc, EUA) e MicroCal Origin 8 (OriginLab Corporation, EUA). Foi aplicado o teste de análise de variâncias (Two-way ANOVA) com pós-teste de Bonferroni para verificar diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratamentos. Em todos os testes foi observado nível de significância de 5%.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do perfil de crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizadas nos experimentos foi realizada a partir da construção da curva de crescimento dos parasitos. Após o descongelamento de uma alíquota ( $1 \times 10^6$  promastigotas/mL) criopreservada em meio  $\alpha$ -MEM completo foi realizada a contagem dos parasitos a cada 24h para a construção da curva, durante sete dias, conforme metodologia previamente descrita. O padrão de crescimento correspondeu ao descrito na literatura, com três fases de crescimento distintas: exponencial/logarítmica, estacionária e estacionária tardia/lag (EVANS, 1989). A figura 1 mostra a curva de crescimento da cepa MHOM/BR/1989/BA199.

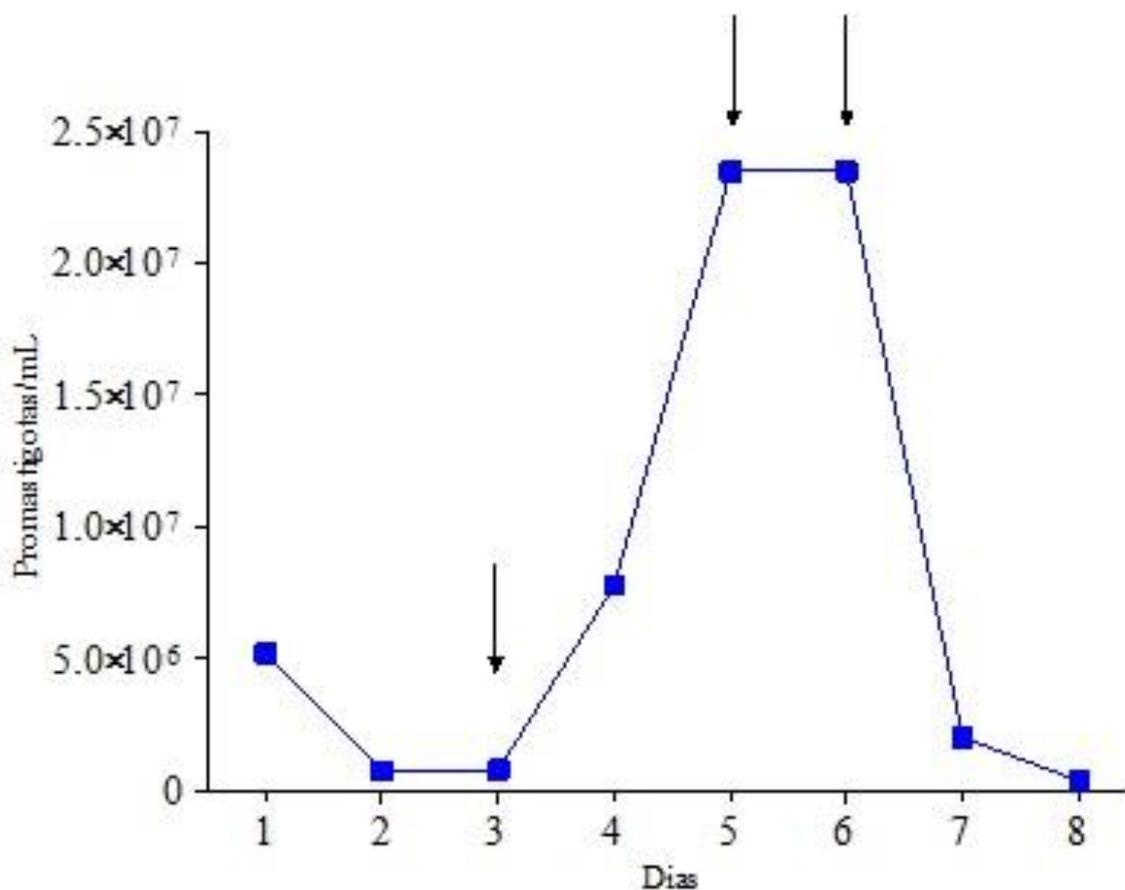


Figura 1 - Curva de crescimento de *Leishmania (L) amazonensis* CEPA MHOM/BR/1989/BA199 em meio a cultura quimicamente definida  $\alpha$ -MEM. Cada ponto representa a média das contagens diárias. As setas indicam o início da fase exponencial (3º dia), estacionária inicial (5º dia) e estacionária tardia (6º dia).

Uma grande variedade de meios de cultura tem sido empregada para cultivar *Leishmanias*, podendo ser divididos em três categorias: semi-sólido, bifásico e líquido (OMS, 1989; OMS, 2010). Enquanto os meios de cultura bifásicos e semi-sólidos necessitam de sangue, um importante fator para a reprodução dos parasitas, a maior parte dos meios de cultura líquidos emprega soro fetal bovino ou eritrócitos lisados (LIMONCU et al., 1997). MERLEN et al. (1999), citam para cultivo das formas promastigotas de *Leishmania*: o meio bifásico, baseado em ágar sangue, conhecido por Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), cultura de tecido de inseto “Schneider” *Drosophila* e de tecido de mamíferos RPMI 1640, sendo todos suplementados com soro fetal bovino (OMS, 2010). De maneira geral, os resultados sugerem que o uso de meio quimicamente definido  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium) para o cultivo e manutenção de *L. amazonensis* cepa MHOM/BR/1989/BA199 no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do ICBIM-UFU se mostrou eficaz e sem causar viés/interferência nos ensaios *in vitro* deste trabalho. Além disso, o meio  $\alpha$ -MEM é de fácil preparo, e custo relativamente reduzido quando comparado à maioria dos meios de cultura citados acima.

A figura 2 é representa a caracterização de um lote de lipossomas no aparelho ZetaSizer Nano ZS90. As análises indicaram que todos os lotes apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas de 200,85nm e o IP entre 0,017-0,089 no momento do uso nos testes *in vitro*. Além da homogeneidade da formulação (IP < 0,3) o tamanho reduzido das vesículas (~200nm) pode favorecer que as formulações atinjam sítios de infecção cujo acesso é mais difícil quando se usa vesículas de tamanho maior (AZEVEDO et al. 2014). A taxa média de 25% encapsulação Sb foi semelhante à obtida para formulações lipossomais de AM (AZEVEDO et al., 2014; SILVA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2008).

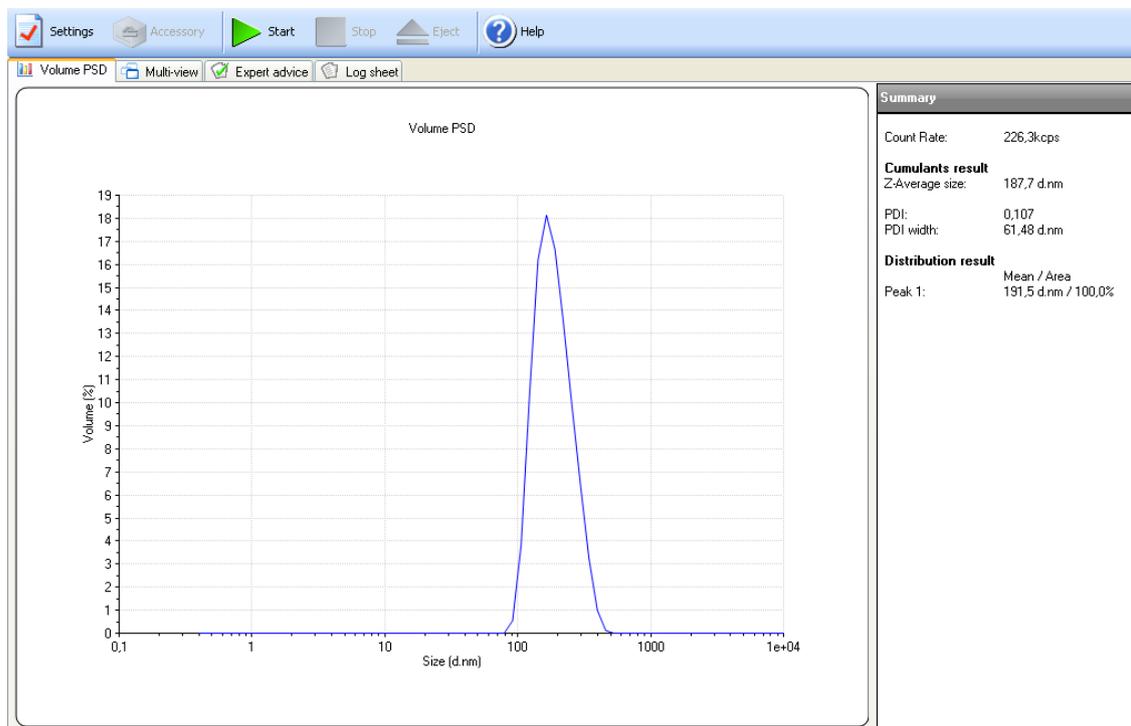


Figura 2 - Imagem representativa da caracterização da formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o aparelho Zetasizer Nano ZS90. O gráfico mostra o diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas e o índice de polidispersão da formulação.

Em média, o potencial zeta dos lotes foi -66mV. O potencial zeta é definido como o potencial elétrico cinético em sistemas coloidais. Formulações com alto potencial zeta (maiores que +30mV ou -30mV) são considerados eletricamente estáveis. Autores sugerem que formulações com cargas acima de +61mV ou de -61mV são consideradas de excelente estabilidade (GREGORIADIS, 2007).

De maneira geral, a formulação HePC-PEG/AM apresentou características de uniformidade de tamanho hidrodinâmico médio de 200,85nm, monodispersão  $IP \approx 0,74$ , alta estabilidade zeta=-66mV (Tabela 1) e boa taxa de encapsulação de Sb. Estas características são fundamentais do ponto de vista farmacotécnico, quando se busca a aplicação comercial de formulações lipossomais como carreadoras de fármacos.

Tabela 1 - Caracterização dos lipossomas peguilados contendo miltefosina e antimoniato de meglumina (HePC-PEG/AM)

---

Características\*

---

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)	Taxa de encapsulação de Sb (%)
HePC-PEG/AM	200,85 ± 0,81	0,074 ± 0,083	-66,0 ± 5,7	25,0 ± 2,5

\*resultados representativos da média dos valores obtidos nas análises de três lotes produzidos de forma independente.

Após a caracterização, as formulações foram testadas em modelo *in vitro* de LT. Inicialmente foi determinado o CC<sub>50</sub>, pelo método de MTT, expondo macrófagos murinos a concentrações variadas de HePC-PEG/AM, tendo como fármaco leishmanicida referência o antimoniato de meglumina (Tabela 2).

Tabela2 - Valores de CC<sub>50</sub> determinados para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e valores de CI<sub>50</sub> determinados para formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/1989/BA199 após incubação por 72 horas com formulações testadas

	CC <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>
	μg/mL	
<b>Miltefosina</b>	41,59	49,59
<b>AM</b>	71,25*	ND <sup>c</sup>
<b>HePC-PEG/AM</b>	103,21	28,34

<sup>a</sup> CC<sub>50</sub> – concentração citotóxica capaz de gerar redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de MTT, calculada por análise de regressão não linear a partir dos dados obtidos em três ensaios independentes realizados em triplicata

<sup>b</sup> CI<sub>50</sub> – concentração citotóxica capaz de gerar redução de 50% no valor da fluorescência nos ensaios de rezasurina, calculada por análise de regressão não linear a partir dos dados obtidos em três ensaios independentes realizados em triplicata

<sup>c</sup>Não determinado

\*Relativo a concentração de Sb<sup>5+</sup>

Foi observado, *in vitro*, menor toxicidade da formulação HePC-PEG/AM em relação aos fármacos livres. Sabe-se que a redução da toxicidade pode dar mais opções de uso terapêutico para os fármacos, possibilitando, por exemplo, o mesmo ser utilizado em doses maiores que as dos fármacos livres sem causar incremento nos efeitos colaterais. Todavia, espera-se que seja evidenciada, *in vivo*, a menor toxicidade da HePC-PEG/AM de diâmetro médio de 200,85nm, como já demonstrado para formulação lipossomal convencional de AM de diâmetro médio de 400nm (SILVA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2008). Ainda, o maior ganho do ponto de vista terapêutico seria a utilização do fármaco encapsulado em lipossomas em doses menores com o mesmo efeito leishmanicida do AM e da miltefosina livres, além disto, redução dos efeitos colaterais e diminuição da possibilidade de seleção de parasitos resistentes ao fármaco em questão (SILVA et al., 2012; FREZARD et al., 2012).

Após a determinação do CC<sub>50</sub> foi avaliada a eficácia *in vitro* da formulação em modelo de amastigotas intracelulares. A figura 3 é representativa do efeito da formulação HePC-PEG/AM em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. No ensaio a formulação foi utilizada na concentração de 16μg de Sb, que

corresponde a 2.5x menos Sb (42µg) contido no AM livre (150 µg/mL) e 10µM de miltefosina. Estes valores foram baseados no CC<sub>50</sub> da formulação e na experiência prévia de nosso grupo de pesquisa em testes *in vitro* com a miltefosina e o AM livre.

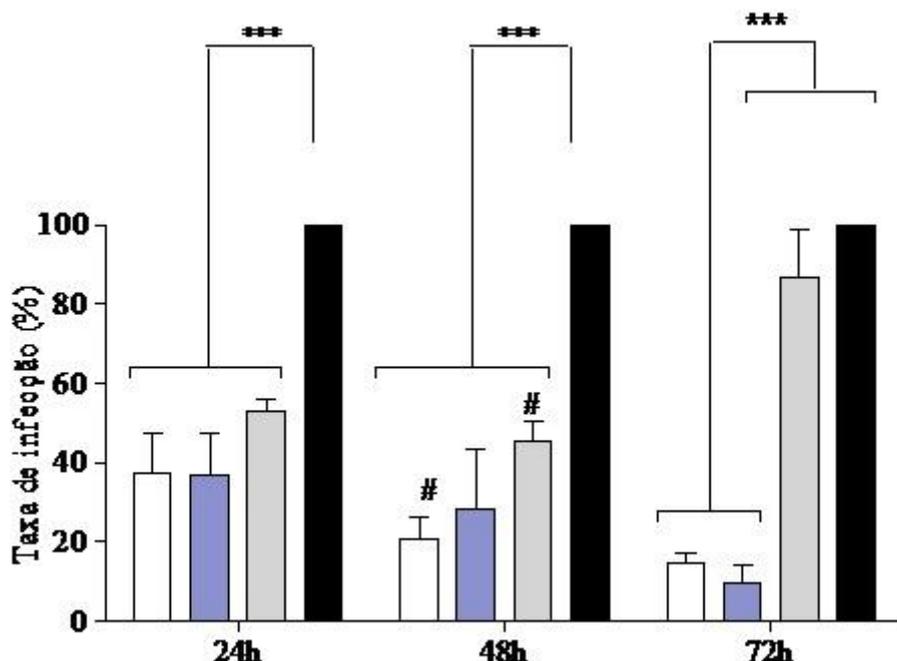


Figura 3 - Ensaio de eficácia de formulação lipossomal de circulação prolongada contendo antimoniato de meglumina e miltefosina (HePC-PEG/AM) (200 nm) contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* cepa MHOM/BR/1989/BA199 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Barra azul → HePC=10 µM; Barra cinza → AM = 150 µg/mL que corresponde a 40 µg/mL de Sb; Barra branca → HePC-PEG/AM → Sb (16 µg/mL) + HePC (10 µM); Barra preta → Controle = macrófagos infectados sem tratamento; \*\*\*p<0,001; #p<0,005; Two-way ANOVA, pós - teste Bonferroni. Figura representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Os dados do teste de infecção demonstraram que a HePC-PEG/AM em concentração de 16 µg/mL de Sb e 10µM de miltefosina apresentou redução significativa das taxas de infecção dos macrófagos nos três tempos avaliados em relação ao grupo controle. Em relação ao AM, a HePC-PEG/AM apresentou redução significativa das taxas de infecção dos macrófagos nos tempos 48h e 72h. Já o AM livre, em concentração de Sb 2.5 maior que a HePC-PEG/AM, reduziu a taxa de infecção em relação ao controle de maneira significativa nos tempos 24h e 48h. Este é um importante resultado, uma vez que HePC-PEG/AM mesmo em menor concentração que a droga referencia, foi capaz de reduzir significativamente as

taxas de infecção *in vitro*, sugerindo efeito prolongado e liberação lenta do Sb encapsulado na vesícula, sem perda da eficácia terapêutica. Os dados sugerem, ainda, possível sinergismo entre o AM e a HePC presentes na formulação lipossomal, uma vez que a formulação em menor concentração de Sb apresentou maior redução da carga parasitária nos macrófagos quando comparada ao AM livre. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por PORTA (2015), que utilizou a formulação HePC-PEG/AM em modelo *in vitro* de leishmaniose visceral.

Não houve diferenças estatísticas entre a HePC-PEG/AM e a miltefosina livre na redução da carga parasitária. Entretanto, o resultado do teste de citotoxicidade demonstrou que o valor do  $CC_{50}$  da miltefosina em formulação lipossomal peguilada contendo AM (252 $\mu$ M) foi 2,5 vezes maior que a miltefosina livre (103 $\mu$ M), sugerindo menor toxicidade celular da droga lipossomal em relação a sua forma livre. Este é um resultado promissor e já relatado para drogas leishmanicidas encapsuladas em formulações lipossomais, como o AM e HePC (FREZARD et al., 2012; PORTA, 2015). A redução da toxicidade pode dar mais opções de uso terapêutico para os fármacos podendo, por exemplo, o mesmo ser utilizado em doses maiores que as do fármaco livre sem causar incremento nos efeitos colaterais. Mas o maior ganho do ponto de vista terapêutico seria a utilização do fármaco em doses menores com o mesmo efeito leishmanicida, com redução dos efeitos colaterais e diminuição da possibilidade de seleção de parasitos resistentes aos fármacos em questão, como já demonstrado para formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina encapsulado (SILVA et al., 2012; FREZARD et al., 2012).

Não há relatos na literatura sobre citotoxicidade e eficácia leishmanicida de formulações contendo dois fármacos leishmanicidas em uma mesma vesícula lipossomal peguilhada para o tratamento da leishmaniose tegumentar.

Acreditamos que este trabalho irá fornecer subsídios encorajadores para os testes de biodistribuição e eficácia terapêutica, *in vivo*, em modelos clássicos de LTA como hamsters, cães e primatas não humanos. Considera-se que após estudos *in vivo* os fármacos encapsulados em vesículas lipossomais poderão contribuir para redução do tempo de terapia e de efeitos adversos, assim como aumentar a adesão ao tratamento.

## 8 CONCLUSÕES

- Obteve-se sucesso no estabelecimento de rotina do cultivo de *Leishmania amazonensis*, assim como na padronização e o desenvolvimento de formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina e antimoníato de meglumina (HePC-PEG/AM) que apresentaram parâmetros físico-químicos compatíveis com sistemas nanoestruturais estáveis para aplicação biológica.

- Nossos resultados sugerem que a formulação HePC-PEG/AM é estável, monodispersa e com vesículas de diâmetro hidrodinâmico médio = 200,85nm, características fundamentais para aplicação em sistemas biológicos, além de favorecer seu direcionamento aos órgãos alvo, com menor toxicidade e eficácia leishmanicida, *in vitro*.

- A formulação lipossomal peguilada apresentou valores de CC<sub>50</sub> semelhantes aos do AM livre, em doses de Sb 2.5 vezes menores, enquanto a eficácia leishmanicida foi semelhante a da miltefosina tendo sua citotoxicidade 2,5 vezes menor que o fármaco livre.

- A formulação lipossomal peguilada contendo miltefosina e antimoníato de meglumina apresentou redução significativa na taxa de infecção de *Leishmania amazonensis* em macrófagos murinos expostos a droga durante 24h, 48h e 72h.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, E.G., RIBEIRO, R.R., DA SILVA, S.M., FERREIRA, C.S. et al. Mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opin Drug Deliv** 11(10):1551-60, 2014
- BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE, D.F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine** 10(6-7):499-503, 2003.
- CORRAL, M.J, GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, E., CUQUERELLA, M., ALUNDA, J.M. Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of Leishmania with Alamar Blue. **J Microbiol Methods**, v. 94, n. 2, p.111-6, 2013.
- DEMICHELI, C., OCHOA, R., SILVA LULA, I., GOZZO, F.C., EBERLIN, M.N., FRÉZARD, F. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumina antimonate. **App Organ Chem**, v.17, p. 226-231, 2003
- ESLAMI, Z.; TANNER, C.E. Time course and intensity of infection in vitro in the resident peritoneal macrophages of resistant and susceptible mice exposed to different doses of *Leishmania donovani* promastigotes. **Int J Parasitol** 24(5):743-7, 1994.
- FRÉZARD, F.; AZEVEDO, E.G.; RIBEIRO, R.R.; DA SILVA, S.M.; DEMICHELI, C.; RESENDE, S. Composição farmacêutica contendo lipossomas convencionais e lipossomas de circulação prolongada para o tratamento da leishmaniose visceral. Pedido de depósito de patente no INPI BR20120052652, 2012.
- FRÉZARD, F.; SCHETTINI; ROCHA, O.G.F.; DEMICHELI, C. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Quím Nova** 28: 511-18, 2005.
- GREGORIADIS, G. Liposome technology - Liposome Preparation and Related Techniques., Ed. Informa Healthcare USA, Inc., 3a ed., v. 1, 324 p. 2007.
- LAINSON, R., SHAW, J.J. NEW WORLD LEISHMANIASIS. IN. COX FEG, WAKELIN D, GILLESPIE SH, DESPOMMIER DD. Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Parasitology, 10th ed., ASM Press, London, p. 313-349, 2005
- LIMONCU, M.E.; BALCIOGLU, I.C.; YERELI, K.; ÖZBEL, Y. and Özbilgin A. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of Leishmania species. **J. Clin. Microbiol.**, 35, 2430–2431, 1997.
- MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonials: old drug for new diseases. **Rev Soc Bras Med Trop** 18: 187-98, 1985.

MERLEN, T.; SERENO, D.; BRAJON, N.; ROSTAND, F.; LEMESRE, J.L. *Leishmania* spp.: Completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for the continuous in vitro cultivation of infective promastigote forms. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 60, 41–50, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1ª Ed. Brasília, Ministério da Saúde, 122 p., 2006.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 65(1-2):55-63, 1983.

OMS, Handbook on isolation and characterization and cryopreservation of *Leishmania*. Edited by David Evans, 1989. 56 paginas.

PAPAGIANNAROS A, BORIES C, DEMETZOS C, LOISEAU PM. Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. **Biomed Pharmacother** 59(10):545-50, 2005.

PORTA. Preparo, caracterização e eficácia *in vitro* de formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina na presença ou ausência de antimoniato de meglumina, para o tratamento da leishmaniose ,2015.

RIBEIRO, R.R., MOURA, E.P., PIMENTEL, V.M., SAMPAIO, W.M., et al. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 2564-2572, 2008

SCHETTINI DA, RIBEIRO RR, DEMICHELI C, ROCHA OG, MELO MN, MICHALICK MS, FREZARD F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **Int J Pharm** 315: 140-147, 2006.

SEIFERT K, CROFT SL. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrob Agents Chemother**50(1):73-9, 2006.

SILVA, S.M.; AMORIM, I.F.; RIBEIRO, R.R.; AZEVEDO, E.G.; DEMICHELLI, C.; MELO M.N.; TAFURI, W.L.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M.S.; FREZARD F. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother** 56(6): 2858-67, 2012.

SILVEIRA FT, LAINSON R, et al. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.99(3), p. 239-251, 2004.

SINAN/SVS/MS. Leishmaniose tegumentar americana-casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação- BRASIL,2017. Disponível em: [HTTP://TABNET.DATASUS.GOV.BR/CGI/TABCGL.EXE?SINANNET/CNV/LTABR.DEF](http://TABNET.DATASUS.GOV.BR/CGI/TABCGL.EXE?SINANNET/CNV/LTABR.DEF); Acesso em: 16 de junho de 2017.

TEMPONE AG, PEREZ D, RATH S, VILARINHO AL, MORTARA RA, DE ANDRADE HF JR. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage

scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **J Antimicrob Chemother**54(1):60-8, 2004

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. **In:** WHO Technical Report Series, n. 949. ed. Geneva, World Health Organization, 201 p., 2010.

## ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### ANÁLISE FINAL Nº 119/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 069/13

Projeto Pesquisa: “Formulação inovadora de lipossomas convencionais e furtivos contendo miltefosina e antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral”.

Pesquisador Responsável: Sydnei Magno da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 24 de Junho de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU