

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Eficácia de nova formulação lipossomal contendo
uma molécula derivada da hederagenina para o
tratamento da leishmaniose visceral

Raquel Martins de Almeida

Belo Horizonte – MG

Fevereiro de 2020

Eficácia de nova formulação lipossomal contendo
uma molécula derivada da hederagenina para o
tratamento da leishmaniose visceral

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Parasitologia da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientador: Profº Drº Ricardo Toshio
Fujiwara

Coorientador: Profº Drº Sebastião Rodrigo
Ferreira

Belo Horizonte – MG

Fevereiro de 2020

Colaboradores

Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG

Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira

Ms. Joseane Camila de Castro

Chiara Cássia Oliveira Amorim

Pablo Hemanoel da Paixão Matias

Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB/UFMG

Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard

Ms. Guilherme Santos Ramos

Departamento de Patologia - ICB/UFMG

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

Departamento de Patologia Clínica Veterinária -Escola de Veterinária/UFMG

Prof. Dr. Fabiola Paes Leme

*Dedico à Deus, meu maior orientador e
aos meus queridos pais, minhas maiores inspirações*

Agradecimentos

À Deus que sempre me guiou e protegeu por todos os meus caminhos e à Virgem Maria, minha grande intercessora, que sempre me pegou no colo quando eu achei que não daria conta.

Aos meus pais por todo amor e apoio durante meu percurso, aguentando minhas ausências e variações de humor. Obrigada pelo grande exemplo de abnegação e por toda torcida, meus queridos. Sem vocês eu não seria nada.

Ao meu professor e orientador, Ricardo Fujiwara, que sempre esteve disposto a acalmar minhas ansiedades e me apoiou em todas as minhas dificuldades da vida acadêmica. Às Professoras Lílian e Daniella por toda ajuda e investimento que proporcionam aos alunos do LIGP.

Ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos que se tornou uma segunda casa. Sem a paciência, carinho e parceria de todos os seus integrantes, eu não conseguiria ter ido a lugar nenhum. Em especial à Michele, grande mãe do laboratório, que sempre está lá para puxar nossa orelha e também para nos defender e à Vanessa por todo apoio técnico. À Joseane que se tornou, além de grande colaboradora, uma grande amiga, me ajudando a entender as loucuras da minha cabeça e ficando doida comigo nos cálculos. À Chiara que esteve comigo antes e durante toda essa aventura chamada 'mestrado'. Sem você, provavelmente, teria agredido algum coleguinha, sido expulsa do programa ou desistido: valeu migs! Ao Fabrício por toda a ajuda nesses últimos tempos. Ao Sebastião, que mesmo de longe, está sempre presente orientando em minhas dúvidas.

Aos animais utilizados nesse estudo: na contínua esperança de, um dia, não precisarmos mais desse recurso. Aos meus amigos, pela paciência, companhia e compreensão em todo esse período. À todos os meus colegas de sala do mestrado e aos professores do departamento de parasitologia. Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, especialmente nas pessoas da Sibeles e Sumara que sempre nos atendem com presteza. À todos os colaboradores envolvidos no trabalho e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

Sumário

Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas.....	9
Lista de Abreviaturas	10
Resumo	12
Abstract.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Leishmanioses	14
1.2. Epidemiologia das Leishmanioses	17
1.3. Prevenção e controle leishmaniose visceral.....	19
1.4. Tratamentos para Leishmaniose Visceral	21
1.4.1. Tratamentos Convencionais	21
1.4.2. Identificação de potenciais fármacos a partir de produtos naturais 24	
1.4.3. Sistema de entrega de fármacos	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVO.....	29
3.1. Objetivos específicos	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1. Obtenção dos materiais	30
4.1.1. Obtenção do derivado da Hederagenina (DHe)	30
4.1.2. Formulação Lipossomal e Caracterização	30
4.1.3. Promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> da cepa MHOM/BR/1974/PP75.....	32
4.1.4. Linhagens celulares.....	32
4.1.5. Camundongos	32
4.2. Avaliação da formulação lipossomal sobre o crescimento <i>in vitro</i> de formas amastigotas intracelulares de <i>Leishmania infantum</i>	33
4.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	34
4.4. Ensaio de viabilidade metabólica (MTT).....	35
4.5. Esquema de tratamento para avaliação da toxicidade em modelo animal.....	36
4.6. Análises histopatológica e semiquantitativa das lesões hepáticas e renais.....	37
4.7. Análises bioquímicas	39
4.8. Avaliação de atividade leishmanicida de FL-DHe <i>in vivo</i>	39

4.9.	Extração de DNA	40
4.10.	PCR em tempo real	41
5.	RESULTADOS	42
5.1.	Formulação lipossomal e caracterização	42
5.2.	Análise da atividade da FL-DHe <i>in vitro</i>	42
5.3.	Análise da viabilidade metabólica das células na presença de FL-DHe 43	
5.4.	Toxicidade em modelo animal.....	44
5.4.1.	Análises histopatológicas e semiquantitativas	44
5.4.2.	Análises bioquímicas	45
5.5.	Testes de avaliação do potencial leishmanicida de FL-DHe <i>in vivo</i>	49
6.	DISCUSSÃO	50
7.	CONCLUSÃO	60
8.	REFERÊNCIAS	61
9.	ANEXOS	75
9.4.	Produção científica.....	75
9.1.1.	Highly potent anti-leishmanial derivatives of hederagenin, a triperpenoid from <i>Sapindus saponaria</i>	75
9.1.2.	Registro de Patente: “DERIVADOS DA HEDERAGENINA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO”	75

Lista de Figuras

Figura 1. Principais formas evolutivas dos protozoários causadores da leishmaniose. _____	15
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp . _____	16
Figura 3. Hederagenina. _____	25
Figura 4. Componentes de formação dos lipossomas. _____	27
Figura 5. Esquema de obtenção do derivado da hederagenina utilizado nos testes. _____	30
Figura 6. Preparo de formulação Lipossomal contendo o fármaco (FL-DHe) e somente com os fosfolipídeos (FL-V). _____	31
Figura 7. Esquema de tratamento das células infectadas com <i>L. infantum</i> _____	33
Figura 8. Esquema de teste de viabilidade celular _____	35
Figura 9. Delineamento do teste de toxicidade de FL-DHe em modelo animal. _	37
Figura 10. Delineamento do teste de atividade leishmanicida de FL-DHe em modelo animal _____	40
Figura 11. Curva dose-resposta de FL-DHe. _____	43
Figura 12. Análises histopatológicas de fígado e rim de camundongos saudáveis após tratamento com PBS, FL-V e diferentes concentrações de FL-DHe. _____	45
Figura 13. Parâmetros bioquímicos avaliados em animais saudáveis após tratamento com PBS, FL-V e diferentes doses de FL-DHe. _____	46
Figura 14. Fotomicrografia de corte histológico do fígado dos animais tratados com PBS, FL-V e diferentes concentrações de FL-DHe. _____	47
Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico do rim dos animais tratados com PBS, FL-V e diferentes concentrações de FL-DHe.. _____	48
Figura 16. Carga resultante após avaliação do potencial leishmanicida de FL-DHe. _____	49

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de atividade leishmanicida, citotoxicidade e índice de seletividade da hederagenina e derivados _____	25
Tabela 2. Programação de Ciclos para técnica de PRC em tempo real _____	41
Tabela 3. Distribuição de diâmetro, IP e PZ das partículas das formulações de FL-V e FL-DHe _____	42
Tabela 4. Resultados das análises de atividade <i>in vitro</i> de FL-DHe _____	43

Lista de Abreviaturas

AmB	Anfotericina B
PP75	Linhagem de <i>Leishmania infantum</i>
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BGM	Linhagem celular de rim de Macaco
BSA	Albumina Sérica Bovina
CC₅₀	Concentração citotóxica requerida para redução da viabilidade em 50%
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animal
DHe	Derivado da Hederagenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPG	Dipalmitoilfosfatidilglicerol
DSPC	Diestearoilfosfatidilcolina
DH82	Linhagem celular de Macrófago canino
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FL-DHe	Formulação Lipossomal contendo derivado da hederagenina
FL-V	Formulação lipossomal vazia
He	Hederagenina
HepG2	Linhagem de hepatócitos humanos
IC₅₀	Concentração requerida para inibir 50% da proliferação
IgG	Imunoglobulina G
IS	Índice de Seletividade
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
MIL	Miltefosina
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
OPD	o-Phenylenediamine
PBS	Tampão Fosfato salino

PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Sb^v	Antimônio pentavalente
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
WHO	World Health Organization

Resumo

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas endêmicas em 98 países com incidência de, aproximadamente, 2 milhões de casos novos por ano. Embora estas doenças tenham sido descobertas há mais de 100 anos, poucas drogas atualmente encontram-se disponíveis para seu tratamento. Além disso, a eficiência do tratamento com base nos fármacos existentes é limitada quanto à sua toxicidade, à presença de resistência biológica e à duração do tratamento. Assim, se faz necessário e importante a busca contínua de novos tratamentos para essas doenças, especialmente por meio do uso de compostos menos tóxicos e sistemas de entrega mais eficientes. O objetivo deste estudo, foi avaliar a eficácia de uma nova formulação lipossomal contendo uma molécula derivada da hederagenina (FL-DHe), um triterpenoide pentacíclico obtido dos frutos de *Sapindus saponaria*, no tratamento da leishmaniose visceral. A formulação desenvolvida apresentou a produção de lipossomos com a média de 141 nm, índice de polidispersão de 0,12 com potencial zeta de -19 mV. A eficácia da formulação na inibição da proliferação de amastigotas de *Leishmania infantum* infectando macrófagos, *in vitro*, foi confirmada apresentando índices de seletividade (IS=8,46) superiores ao controle positivo utilizando Anfotericina B (IS<2). A formulação também apresentou baixa toxicidade sobre os macrófagos, células renais e hepáticas. Nos testes de toxicidade em animais, os grupos foram tratados com diferentes concentrações de FL-DHe e, após análises bioquímicas e histopatológicas, o caráter atóxico foi mantido, não apresentando diferenças significativas ($p \geq 0,05$), quando comparados ao grupo controle PBS, em nenhuma das concentrações. Os resultados sobre sua atividade em modelo animal evidenciaram que, na dose utilizada, não foi observada diferenças estatísticas entre o grupo tratado com FL-DHe, em comparação a grupos infectados não tratados. Entretanto, um aumento da carga parasitária nos grupos tratados com lipossomas vazios (FL-V) pode indicar que os componentes da formulação influenciaram na ação do composto. Em suma, os resultados demonstraram o grande potencial leishmanicida da formulação e sua baixa toxicidade *in vitro*, sendo necessários estudos em prol do refinamento de seu protocolo terapêutico e da formulação lipossomal, visando potencializar a atividade do composto em modelo murino.

Palavras chave: *Leishmania infantum*, fármacos, hederagenina, lipossoma.

Abstract

Leishmaniasis are neglected tropical diseases endemic in 98 countries with an incidence of approximately 2 million new cases per year. Although these diseases were discovered more than 100 years ago, few drugs are currently available for their treatment. In addition, the efficiency of treatment based on existing drugs is limited in terms of its toxicity, the presence of biological resistance and the duration of treatment. Thus, it is necessary and important to continuously search for new treatments for these diseases, especially through the use of less toxic compounds and more efficient delivery systems. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of a new liposomal formulation containing a molecule derived from hederagenin (FL-DHe), a pentacyclic triterpenoid obtained from the fruits of *Sapindus saponaria*, in the treatment of visceral leishmaniasis. The developed formulation showed the production of liposomes with an average of 141 nm, polydispersion index of 0.12 with zeta potential of -19 mV. The effectiveness of the formulation in inhibiting the proliferation of *Leishmania infantum* amastigotes infecting macrophages, *in vitro*, was confirmed by presenting selectivity indexes (IS = 8.46) higher than the positive control using Amphotericin B (IS <2). The formulation also showed low toxicity on macrophages, kidney and liver cells. In animal toxicity tests, the groups were treated with different concentrations of FL-DHe and, after biochemical and histopathological analyzes, the non-toxic character was maintained, with no significant differences ($p \geq 0.05$), when compared to the PBS control group, in none of the concentrations. The results on its activity in an animal model showed that, at the dose used, there were no statistical differences between the group treated with FL-DHe, compared to untreated infected groups. However, an increase in parasitic load in the groups treated with empty liposomes (FL-V) may indicate that the components of the formulation influenced the action of the compound. In summary, the results demonstrated the great leishmanicidal potential of the formulation and its low toxicity *in vitro*, requiring studies in favor of the refinement of its therapeutic protocol and liposomal formulation, aiming to enhance the activity of the compound in a murine model.

Keywords: *Leishmania infantum*, drugs, hederagenin, liposome.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais negligenciadas que possuem como agente etiológico protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. Esse gênero possui 53 espécies já descritas e distribuídas nos subgêneros *Viannia*, *Leishmania*, *Sauroleishmania*, e nos complexos *L. enriettii* e *Paraleishmania* (Akhoundi et al., 2016). Dentre as espécies, 31 são conhecidas por possuírem a capacidade de parasitar mamíferos, sendo 20 patogênicas para seres humanos agrupadas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Tsokana et al., 2014; Silveira et al., 2004).

Os representantes patogênicos desses dois subgêneros podem causar um amplo espectro de manifestações clínicas que são classificadas, principalmente, em 3 formas: (1) leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2020).

A LC pode provocar lesões cutâneas, principalmente úlceras indolores, que normalmente estão localizadas em áreas expostas da pele. Possuem um formato arredondado ou ovalado, que é uma lesão característica, e pode medir de milímetros à centímetros (MS, 2017). Caso não tratadas, as lesões tendem a evoluir para cura espontânea em um período que pode variar de alguns meses a anos e deixar cicatrizes permanentes ou as lesões podem, também, permanecer ativas por vários anos e até existirem em simultâneo com lesões mucocutâneas posteriores. (MS, 2017; WHO, 2020)

Já na LMC podem ocorrer lesões destrutivas parciais ou totais das mucosas das vias aéreas superiores (nariz, boca e garganta) (MS, 2017). Elas podem aparecer como uma lesão secundária às lesões de LC que foram curadas espontaneamente ou após ser realizado um tratamento inadequado (MS, 2017). Geralmente, a lesão é indolor e costuma acometer mais a mucosa nasal, tendo início no septo nasal anterior onde, normalmente, é fácil a sua visualização (MS, 2017). Outras lesões podem ocorrer, também, na orofaringe, laringe, lábios, palato e, em casos mais excepcionais causar lesões na traqueia (MS, 2017; WHO, 2020).

A LV é uma doença grave e crônica que apresenta altos índices de letalidade se não for tratada (Harhay et al, 2011). Os indivíduos infectados podem apresentar quadros clínicos assintomáticos, o que ocorre na maioria dos casos, ou alguma das manifestações clínicas clássicas caracterizadas por crises irregulares de febre, hepatoesplenomegalia, anemia, manifestações hemorrágicas, linfadenomegalia e perda de peso com progressão para desnutrição (Badaro et al., 1986, WHO, 2020). Nas Américas a doença é causada pela espécie *Leishmania infantum*, foco desse trabalho, que possui como vetor fêmeas infectadas de *Lutzomyia longipalpis*, sendo o cão doméstico considerado o principal reservatório do parasito no ciclo urbano (Lainson & Rangel, 2005; Souza et al. 2009).

Os protozoários responsáveis pelas três manifestações citadas, apresentam-se, principalmente, nas formas amastigotas, promastigotas, e promastigotas metacíclicas, formas essas definidas de acordo com o hospedeiro e etapa do ciclo em que se encontram (Neves, 2016; Handman 2001; Pimenta, 2012).

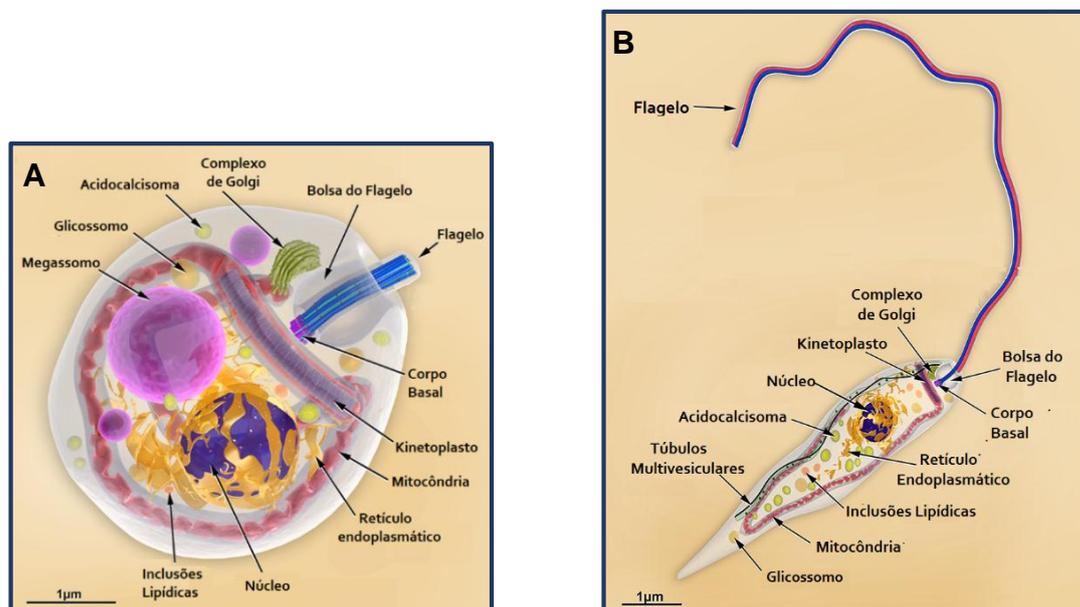


Figura 1. Principais formas evolutivas dos protozoários causadores da leishmaniose. A) Forma amastigota, encontrada parasitando as células de mamíferos. **B)** Forma promastigota, encontrada no interior do vetor invertebrado. (Adaptado de Teixeira et al, 2013)

As formas amastigotas (Figura 1-A) são ovais, esféricas ou fusiformes e não apresentam flagelo livre. São encontradas parasitando células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente macrófagos, do hospedeiro vertebrado (Handman 2001; Kaye & Scott, 2011; Neves, 2016). Já as formas promastigotas (Figura 1-B) são alongadas e contam com a presença de um flagelo livre e longo sendo localizadas no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados

(flebotomíneos) (Handman 2001; Pimenta, 2012; Neves, 2016). As promastigotas metacíclicas são as formas infectantes para os hospedeiros vertebrados; possuem o diâmetro do corpo nos menores limites apresentados pelas promastigotas; seu flagelo chega a medir cerca de duas vezes mais do que o comprimento do corpo e essas formas são encontradas livres nas porções anteriores do trato digestivo do inseto vetor (Handman 2001; Kaye & Scott, 2011; Neves, 2016)

O ciclo biológico (Figura 2) se divide em duas fases principais que irão acontecer no vetor ou no mamífero hospedeiro. Ele tem início quando a fêmea de flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero infectado com *Leishmania* spp.. Durante o repasto, a fêmea adquire formas amastigotas junto com o sangue e, dentro do vetor, os parasitos escapam da matriz peritrófica para a luz de seu intestino. O sangue, após digerido, passará para o intestino posterior sendo eliminado (Kaye & Scott, 2011; Handman 2001; Neves, 2016).

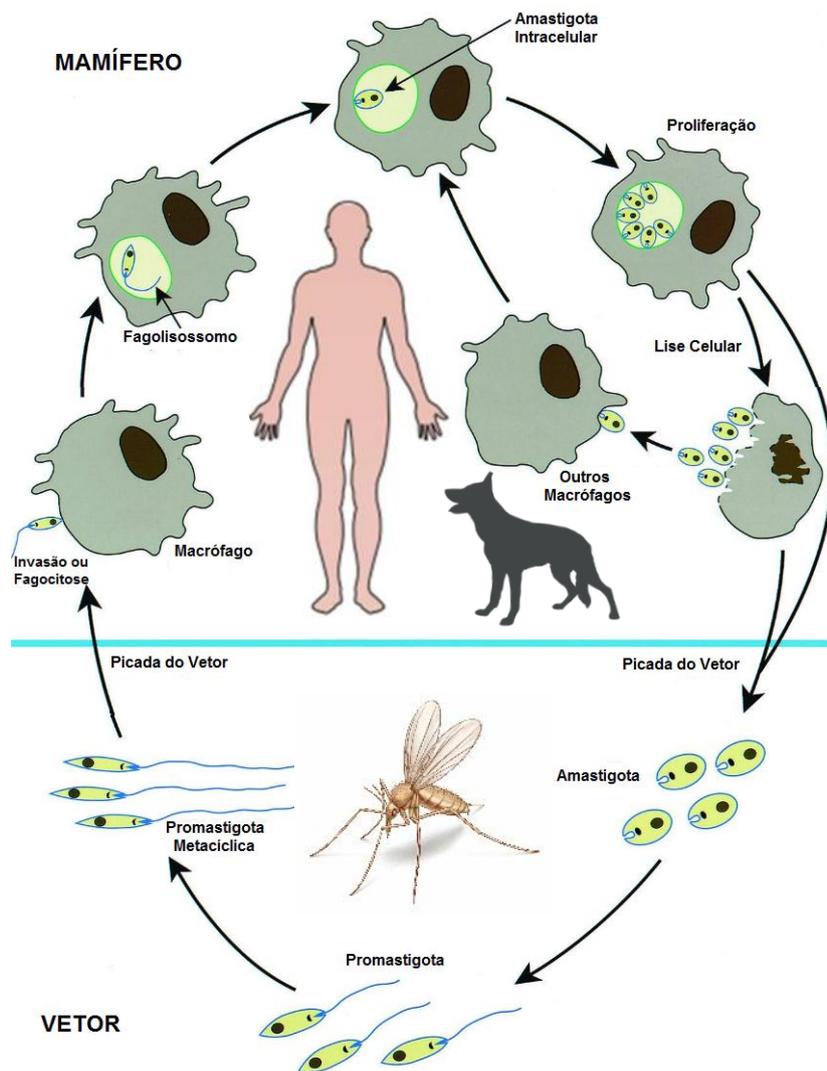


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Adaptado de Handman 2001)

No tubo digestivo do inseto as amastigotas se diferenciam em promastigotas, as quais sofrem uma série de alterações morfológicas e fisiológicas, diferenciando-se, pelo menos em parte, em paramastigotas e no final do ciclo em promastigotas metacíclicas, que se movem para a parte anterior do tubo digestivo do flebotomíneo (Kamhawi, 2006; Kaye & Scott, 2011; Melo, 2016).

Desta forma, ao se alimentarem novamente, os insetos depositam as formas promastigotas metacíclicas, no local da picada, na pele do novo hospedeiro. Uma vez no mamífero, os parasitos são fagocitados ou invadem as células do SMF, principalmente macrófagos, e se diferenciam novamente em amastigotas, formas que conseguem sobreviver dentro dos fagolisossomos, onde se multiplicam (Kaye & Scott, 2011). Após sucessivas multiplicações, as células parasitadas sofrem lise ou entram em apoptose espalhando as amastigotas no meio extracelular, onde estarão disponíveis para serem fagocitadas por novos macrófagos ou outra célula do SMF. O ciclo se completa quando as amastigotas são ingeridas novamente por flebotomíneos que se alimentarão no hospedeiro infectado (Kaye & Scott, 2011; Melo, 2016).

1.2. Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses estão inseridas entre as doenças mais negligenciadas do mundo e são caracterizadas por afetar, principalmente, países classificados como mais pobres e países ainda em desenvolvimento (Inceboz, 2019). Estima-se que existam, aproximadamente, 12 milhões de pessoas doentes e que, anualmente, ocorram cerca de 2 milhões de novos casos (Kedzierski, 2010; Fiocruz, 2019a). Além disso, 350 milhões pessoas se encontram expostas ao risco de infecção pelas leishmanioses em todo o mundo com 20 a 30 mil mortes anuais, sendo considerada uma das enfermidades transmitidas por vetores com maior relevância (Kedzierski, 2010; Fiocruz, 2014; Fiocruz, 2019a; Inceboz, 2019; WHO, 2020).

Mais de 85% dos casos registrados, em 2018, para LC estavam presentes em 10 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, Síria e Tunísia, sendo que, 84% foram reportados pelo Brasil (OPAS, 2019; WHO, 2020). Mundialmente, a ocorrência da LC é de 600.000 a 1 milhão de novos casos, anualmente (WHO, 2020)

No Brasil, dados de LC registrados entre 2003 e 2018, mostraram a ocorrência de mais de 300.000 casos, com uma média de 21.158 casos por ano (MS, 2019). Em todo o território, o coeficiente médio de detecção foi de 11,3 casos a cada 100.000 habitantes, e os maiores valores desse coeficiente, foram registrados na região Norte do país, seguido pela região Centro-Oeste. (MS, 2019; WHO, 2020).

Já os dados para LV mostraram que, também em 2018, que mais de 95% dos novos casos foram observados, também, em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (Inceboz, 2019; WHO, 2020). Levando em consideração os dados registrados nas Américas, 96% dos casos de LV são reportados somente no Brasil com registros de casos, principalmente nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste. (OPAS, 2018; MS, 2019). No período de 2003 a 2018, 51.000 casos humanos foram confirmados no país, apresentando uma incidência média de 1,7 casos a cada 100.000 habitantes (MS, 2019).

Dados registrados no ano de 2018 pelo Data Sus, apontam que o estado de Minas Gerais estava citado entre os principais locais de registro de LV no Brasil, apresentando 434 casos, ficando atrás somente do estado do Pará (562) e do Maranhão (725) e, entre os municípios Mineiros onde mais são reportados os casos, destacam-se as cidades de Belo Horizonte (132), Montes Claros (58) e Januária (46) (DataSus, 2020).

Entretanto, apesar de ser endêmica das regiões citadas, a LV é considerada uma doença em expansão apresentando, nos últimos anos, registro de casos em locais onde antes não havia incidência da doença como a região Sul do país (USP, 2020).

Estudos realizados ao longo dos anos buscaram identificar quais eram as prováveis causas da propagação da LV no Brasil. Dentre os fatores foram citadas como possíveis causas, a migração de trabalhadores e animais entre os estados durante desenvolvimento da região Centro-Sul, além de migrações em regiões fronteiriças entre países como Bolívia (Gasoduto Bolívia-Brasil) e Paraguai (dispersão pela tríplice fronteira) além de vários episódios de desmatamentos, todos esses fatores facilitando um transporte de pessoas doentes, hospedeiros e vetores desse parasito (Alencar, 1983; Oliveira et al., 2006, Antonialli et al., 2007;

Werneck, 2008; Motoie et al., 2013; Oliveira et al., 2016; Grill & Zurmendi, 2017; WHO, 2017; Oliveira et al., 2018; Bezerra et al., 2018).

Apesar da LV apresentar um menor número de casos em comparação à LC, deve-se considerar que sua expansão pelos territórios, onde não eram anteriormente registrada e seu aumento progressivo no Brasil e em outros países endêmicos, é um risco muito grande, pois se trata de uma doença silenciosa, de caráter mais grave do que as formas de LC e LMC e que chega a registrar 90% de óbito em pacientes graves não tratados, atingindo o índice de letalidade de 8,8% no Brasil, em 2017 (MS, 2005; Harhay et al, 2011; MS, 2017; OPAS, 2018). Assim, torna-se fundamental o investimento em mecanismos de controle dessa doença adotando medidas necessárias para sua prevenção, tratamento e redução de sua expansão.

1.3. Prevenção e controle leishmaniose visceral

Como já descrito no ciclo das leishmanioses, sua transmissão envolve um complexo sistema biológico que engloba o hospedeiro humano, o protozoário parasito, o vetor flebotomíneo e, em algumas situações, um reservatório animal. Portanto, é improvável que o controle seja alcançado por uma única intervenção, sendo necessário um conjunto de estratégias, adaptadas a cada contexto, que levem em conta a realização de um controle vetorial integrado à educação em saúde, a realização de diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos e, a eutanásia cães infectados (Killick-Kendrick, 2010; Alves et al., 2018).

Assim, as medidas gerais empregadas no controle do vetor têm como foco a interrupção ou redução da transmissão do parasito causador da doença, objetivando a redução do número de flebotomíneos a partir do uso de inseticidas de ação residual ou impregnado em telas e redes, como os 'mosquiteiros' e limpeza de possíveis criadouros do inseto; eutanásia de cães infectados, visto que o tratamento dos animais doentes não é recomendado no Brasil de acordo com orientação do Ministério da Saúde (MS), visando reduzir a presença desse tipo de reservatório em meio urbano e, conseqüentemente, diminuir a transmissão da doença para o ser humano; tentar prevenir do contato dos cães com o vetor evitando passeios com animais no horário de preferência de repasto do vetor e utilizando coleiras impregnadas com deltametrina a 4% ; o tratamento de pessoas

doentes e a educação em saúde (Seva et al., 2016; WHO,2020).Entretanto, a maioria das medidas de controle são de difícil realização ou apresentam eficácia abaixo do esperado.

Em relação ao controle da transmissão, já é possível verificar relatos de problemas com casos de resistência do inseto vetor a alguns dos inseticidas existentes (De Camargo-Neves et al., 2007; Maciel et al., 2010). Ademais, a eliminação de criadouros é problemática, pois o vetor utiliza matéria orgânica, principalmente de origem vegetal, em decomposição como criadouro, o que torna inviável a identificação e eliminação de todos eles. (Fiocruz, 2019b)

A realização da eutanásia de cães infectados gera muita resistência entre os donos dos animais e, quando ela é autorizada, observa-se uma alta taxa de substituição dos animais eutanasiados por outros cães, levando a um aumento da rotatividade dos animais e gerando uma população canina mais jovem que pode ser mais suscetível não somente à LV, mas a outros tipos de doenças (Nunes et al., 2008; Rocha et al., 2020). Além disso, as medidas de prevenção como uso coleiras impregnadas e redução de passeios no horário do repasto do vetor podem não ser 100% eficientes na prevenção do contato do animal com o inseto uma vez que os criadouros são presentes no ambiente peridomiciliar devido ao alto grau de sinantropia do vetor (Lainson & Rangel, 2005; Souza et al., 2004; Carvalho et al., 2010).

Um estudo realizado na cidade de Belo Horizonte sobre o conhecimento da LV demonstrou que metade dos indivíduos infectados desconhecia a doença completamente e apenas 1,2% reconheciam o inseto vetor (Borges et al. 2008). Outro dado importante do estudo foi o de que as pessoas não alfabetizadas possuíam oito vezes maior probabilidade de serem acometidas pela LV (Borges et al. 2008). Assim, percebe-se o quanto a educação em saúde pode ser uma ótima aliada no controle da maioria das doenças parasitárias, mas ainda não é uma medida que resolveria sozinha o controle da disseminação da doença.

Como ainda não há uma vacina imunizante, uma das alternativas mais viáveis para controle da doença é o tratamento das pessoas doentes, caindo em outro viés, por se tratar de uma doença silenciosa onde os pacientes podem apresentar-se assintomáticos ou oligossintomáticos dificultando o diagnóstico precoce (Kedzierski, 2010; Evans & Kedzierski, 2011; Singh et al., 2014b;

Allahverdiyev et al., 2017). Além disso, os fármacos disponíveis para a terapêutica são poucos - quase os mesmos a 50 anos -, apresentam altas taxas de toxicidade e alguns deles já apresentam casos de resistência parasitária o que pode atrapalhar o tratamento efetivo e imediato de pacientes diagnosticados, sendo necessárias busca contínuas de alternativas para o tratamento (Rath et al., 2003; Soares-Bezerra et al. 2004; Kedzierski, 2010; Sundar et al., 2012; Ammar et. al., 2019). A seguir serão abordados alguns dos fármacos utilizados e suas particularidades.

1.4. Tratamentos para Leishmaniose Visceral

1.4.1. Tratamentos Convencionais

Alguns fármacos encontram-se disponíveis para o tratamento das leishmanioses como, por exemplo, os antimoniais pentavalentes (Sb^V), desoxicolato de anfotericina B (AmB) e miltefosina (MIL) (Soares-Bezerra et al. 2004). Porém todos apresentam significativas limitações em relação à toxicidade, preço e/ou longo tempo administração. (Rath et al., 2003; Soares-Bezerra et al. 2004; Kedzierski, 2010; Sundar et al., 2012; Ammar et. al., 2019).

O Sb^V foi introduzido no mercado a mais de 60 anos atrás e constituía um padrão-ouro para o tratamento (Rath et al., 2003). Nas últimas décadas, foi observado um rápido desenvolvimento de resistência aos compostos utilizados para o tratamento, particularmente aos Sb^V em áreas endêmicas, devido ao preço e a falta de supervisão no cumprimento dos tratamentos (Rath et al., 2003). Nessas áreas onde vêm ocorrendo resistência ao Sb^V , vem utilizando-se, alternativamente, fármacos como a AmB e a MIL (WHO, 2009; Rojo et al., 2015).

A dose desse fármaco normalmente recomendada para se utilizar no tratamento é de 20mg/kg/dia durante 20 a 40 dias com o limite de 3 ampolas, de 5mL cada, por dia (405mg de Sb^V /ampola) (MS, 2005, Pelissari et al. 2011).

As doses podem ser administradas pelas vias parenteral, intramuscular ou endovenosa, sendo a mais aconselhada a via endovenosa com aplicação lenta (5 minutos de aplicação), pois nessa via não é necessário realizar diluições permitindo a aplicação de doses mais adequadas além de possuir menor inconveniente de dor local, observado principalmente na via intramuscular (MS, 2006).

Por ser rapidamente absorvido, cerca de 90% do antimônio administrado é depurado e excretado pelos rins nas primeiras 48 horas, sendo assim, necessário a administrar, de forma contínua, elevadas doses desse fármaco para atingir sua eficácia, aumentando o potencial tóxico do tratamento com esse composto (Rath et al. 2003). Efeitos colaterais normalmente associados ao Sb^v são mialgias, alterações hepáticas, nefrites, dores abdominais, além de distúrbios dos sistemas cardíaco, respiratório e gastrointestinal (Rath et al. 2003).

A MIL foi desenvolvida na década de 80, originalmente, para ser um medicamento antitumoral (Sundar & Olliaro, 2007; Dos Santos Nogueira et al., 2019). Seu uso para o tratamento das leishmanioses foi aprovado, pela primeira vez, na Índia em 2002 sendo considerado o primeiro fármaco oral que se mostrou eficaz no tratamento das leishmanioses (Sundar et al., 2012).

A dose recomendada pode variar de 2,5 a 150mg/kg dependendo da idade e peso do paciente, sendo administrada por via oral durante 28 dias (WHO,2010). Dada a sua meia-vida longa, esse medicamento deve ser utilizado sob supervisão para evitar a potencial seleção de cepas de parasitos resistentes (WHO, 2009).

Geralmente, os efeitos colaterais associados ao seu uso no tratamento estão relacionados ao trato gastrointestinal, como náuseas, vômito e diarreias. Outros sintomas mais graves já descritos são a pancreatite aguda e possíveis efeitos teratogênicos, não sendo indicado seu uso por mulheres grávidas ou com potencial para engravidar durante o tratamento ou em um período de 3 meses após seu término (WHO, 2010; Monge-Maillo & López-Vélez, 2015). Em 2016, no Brasil, seu uso foi liberado para o tratamento de cães infectados, sendo o primeiro fármaco autorizado para esse fim, no país. (SBMT, 2016).

Já a AmB é um antibiótico que apresenta atividade antifúngica e leishmanicida, mas possui alto custo, efeitos colaterais e episódios de toxicidade que limitam a eficiência terapêutica e a aplicabilidade clínica deste medicamento (Pelissari et al. 2011; Ammar et. al., 2019).

Em gestantes e pacientes com idade inferior a 6 anos e superior a 65 anos a AmB está indicada como tratamento de primeira escolha assim como em casos graves de desnutrição, infecções bacterianas, comorbidades e algumas manifestações clínicas como: fenômenos hemorrágicos, icterícia, edema

generalizado, entre outras (MS, 2006; Pelissari et al. 2011). É aconselhado o seu uso como segunda opção de tratamento em pacientes que apresentem alguma contraindicação ou apresentem toxicidade ou refratariedade após o uso de Sb^V (MS, 2006).

O uso clínico da AmB está associado à diversos efeitos colaterais frequentes e graves, como anemia, náuseas, vômitos, febres, nefrotoxicidade que, quase sempre, resulta em disfunção renal de gravidade variável entre os pacientes tratados levando à interrupção frequente de tratamento nesses casos (Filippin et al., 2006; Pelissari et al. 2011; Ammar et. al., 2019).

Outra apresentação da AmB disponibilizada pelo MS é a AmB Lipossomal (MS, 2006; Pelissari et al. 2011). Esse tipo de formulação possui eficácia comparável ao AmB convencional, porém apresenta menor toxicidade (MS,2006, Pelissari et al. 2011). Seu alto custo inviabiliza o seu uso na saúde pública, sendo restrito para tratamento de pacientes que passaram por transplante renal ou apresentem insuficiência renal (alterações histopatológicas do rim e taxa de filtração glomerular $<60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$), em casos onde houve falha terapêutica ou em casos de toxicidade ao uso de AmB convencional (MS,2006). Os efeitos adversos que podem ser observados são a nefrotoxicidade, febre, cefaléia náusea, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar (MS, 2006; Pelissari et al. 2011).

A dosagem recomendada de AmB é de 1mg/kg/dia por via endovenosa, não ultrapassando a dose diária de 50mg, por um período de 14 a 24 dias e seu tempo de infusão pode levar de 2 a 6 horas (MS, 2006, Pelissari et al. 2011; Ammar et. al., 2019). No caso da formulação lipossomal, orienta-se que seja administrado 3mg/kg/dia, durante sete dias ou 4mg/kg/dia, durante cinco dias por infusão venosa, em dose única diária. O tempo de infusão pode levar de 30 a 60 minutos. (MS, 2006 Pelissari et al. 2011).

Contínuas pesquisas que objetivam desenvolver novos fármacos para o tratamento da leishmaniose vêm progredindo aos poucos, entretanto, devido à falta de melhores terapias ainda existe uma grande necessidade de identificação de potenciais fármacos que sejam mais eficientes e seguros (Rodríguez- Hernandez et al., 2016b).

1.4.2. Identificação de potenciais fármacos a partir de produtos naturais

Uma alternativa na busca por novos fármacos são os produtos naturais. Eles são uma potencial fonte de novos compostos que podem ser usados como fármacos ou como fonte de estruturas líderes para o desenvolvimento de novos agentes no tratamento de várias doenças, incluindo algumas doenças tropicais negligenciadas como a leishmaniose (Mishra & Tiwari, 2011; Singh et al., 2014a; Hussain et al., 2014; Newman & Cragg, 2016).

Entre as várias classes de produtos naturais com atividade leishmanicida, alguns ácidos triterpenoicos pentacíclicos naturais, como ácido betulínico, ácido ursólico e seus derivados, mostraram alguma atividade (Singh et al., 2014a; Haavikko et al., 2014; Lopes et al., 2011). Recentemente, os compostos triterpênicos de ácido oleanólico e lanosterol mostraram ser potentes agentes leishmanicidas contra as espécies *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (Melo et al., 2016).

Em um recente trabalho do nosso grupo de pesquisa em parceria com o Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foi estudado os efeitos da Hederagenina (He) (figura 3-A), um triterpenoide pentacíclico do tipo oleano que exibe atividades anti-inflamatórias antifúngicas, leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. infantum* e *L. tropica* e antimicrobianas, bem como citotoxicidade para diferentes linhas de células tumorais (Takagi et al., 1980, Timon-David et al., 1980; Majester-Savornin, 1991; Ribeiro et al., 1995; Albiero et al., 2002; Saha et al., 2010; Gauthier et al. 2009; Rodríguez-Hernandez et al., 2015). Este ácido triterpenóico pode ser extraído em grandes quantidades dos frutos de *Sapindus saponaria* (*Sapindaceae*) (Figura 3-B), uma árvore tropical popularmente conhecida no Brasil como "sabão-de-soldado", "saboneteira", entre outras denominações (Albiero et al., 2001, Rodríguez-Hernandez et al., 2015). Pelos potenciais efeitos farmacêuticos e por ser um produto de fácil obtenção – que poderia levar a baixos custos de produção-, essa molécula gerou grande interesse de nosso grupo de pesquisa em avaliar sua ação sobre as formas amastigotas, o que ainda não havia sido realizado.

Além da própria He avaliamos, também, o potencial de ação de 60 derivados, obtidos após alterações em sua estrutura química, e a suas eficácias em inibir a proliferação de amastigotas intracelulares. Após os experimentos, foi comprovada a eficácia, *in vivo*, da He e de oito de seus derivados, como pode ser observado na tabela 1 (Rodríguez- Hernandez et al., 2016b). A partir desses dados, selecionamos o composto com os resultados mais promissores e partimos para a fase de testes de segurança e atividade leishmanicida *in vivo*.

Tabela 1. Valores de atividade leishmanicida, citotoxicidade e índice de seletividade da hederagenina e derivados

Composto	IC ₅₀ (µM)	MØ CC ₅₀ (µM)	SI
He	61.6 ± 0.25	<1000	10
3	9.7 ± 0.12	63.0 ± 0.17	6.4
4	12.0 ± 0.12	83.0 ± 0.21	6.9
22	18.0 ± 0.13	32.5 ± 0.18	1.8
32	38.0 ± 0.08	21.0 ± 0.12	0.5
34	32.0 ± 0.13	212 ± 0.12	6.6
44	11.0 ± 0.09	66.0 ± 0.09	6.0
49 *	2.0 ± 0.16	45.0 ± 0.15	22.5
52	6.0 ± 0.06	16.0 ± 0.15	2.6
Sb ^V	80.0 ± 0.13	8.0 ± 0.07	0.1

IC₅₀: Concentração requerida para inibir 50% da proliferação de amastigotas. **CC₅₀**: Concentração de citotoxicidade do fármaco que resulta em 50% da mortalidade celular. **IS**: Índice de Seletividade que demonstra o quanto a ação de um composto é direcionada ao parasito sem causar danos às células dos mamíferos (Maior valor → mais seletiva sua ação → Maior segurança). **MØ**: Macrófagos Caninos DH82. **Sb^V**: Antimônio Pentavalente. (*): Composto selecionado para seguir nos testes.

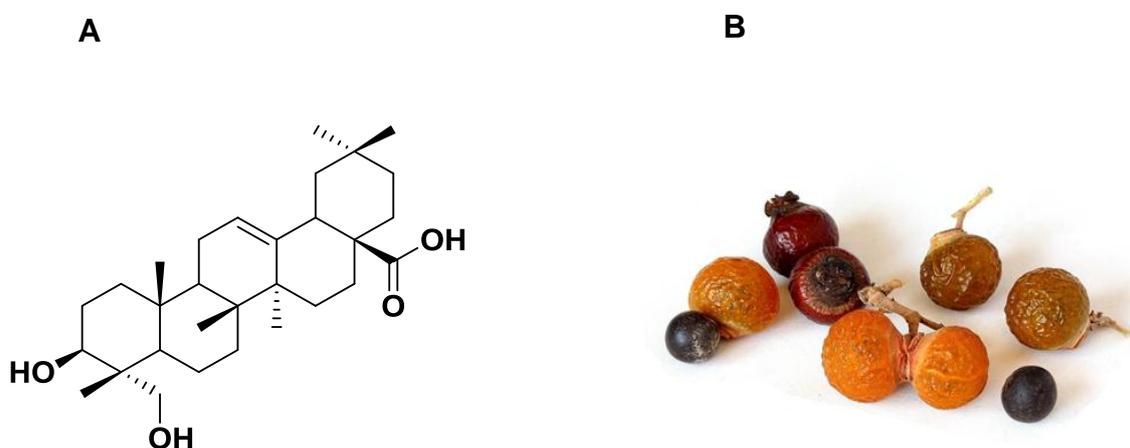


Figura 3. Hederagenina. A) Estrutura química da Hederagenina (Adaptado de Rodríguez-Hernandez et al., 2016a); **B)** Frutos de *Sapindus saponaria* (Adaptado de Viveiro Ciprest).

1.4.3. Sistema de entrega de fármacos

Outra alternativa que vem sendo amplamente estudada na busca por novas terapias é a utilização de sistemas de entregas de fármacos que podem potencializar a ação de um composto prolongando sua ação e melhorando sua administração (Mishra et al, 2010; Gaona, 2016).

Nas últimas décadas, um dos sistemas de entrega melhor estudados são os lipossomas (Allen & Cullis, 2013; Van Swaay & DeMello, 2013). Isso se deve ao fato das partículas lipossomais serem biodegradáveis e, assim, apresentarem fraca imunogenicidade e baixa toxicidade. (Rajendran et al, 2012; Allen & Cullis, 2013). Além disso, devido à semelhança com a composição de membranas celulares, interagem bem com as células levando à melhores resultados de absorção, pois facilita a liberação do fármaco no local mais adequado, evitando sua perda e degradação no organismo (Rajendran et al, 2012). Com isso, é possível gerar uma redução nas doses de tratamento, na toxicidade e efeitos colaterais de um fármaco, proporcionando uma maior eficácia e segurança ao tratamento (Allen & Cullis, 2013).

1.4.3.1. Lipossomas

Lipossomas são vesículas de bicamadas concêntricas formadas por agregados coloidais, geralmente constituídos por fosfolipídeos (Figura 4-B) como a diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), de onde os seus componentes organizam-se espontaneamente em estruturas fechadas em forma de esfera (Figura 4-A) quando são expostos a um meio aquoso (Santos & Castanho, 2002). Os fosfolipídeos possuem a característica típica de apresentar o caráter anfipático, ou seja, possui uma cabeça polar hidrofílica ligada a uma ou duas cadeias carbônicas hidrofóbicas. Esse tipo de conformação permite a incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto de hidrofóbicas, o que o torna um vantajoso sistema carreador de fármacos (Santos & Castanho, 2002).

Para o preparo de lipossomas, normalmente, são avaliados parâmetros físico-químicos que levam em consideração seu diâmetro, índice de polidispersão (IP) e Potencial Zeta (PZ) (De Souza, 2013).

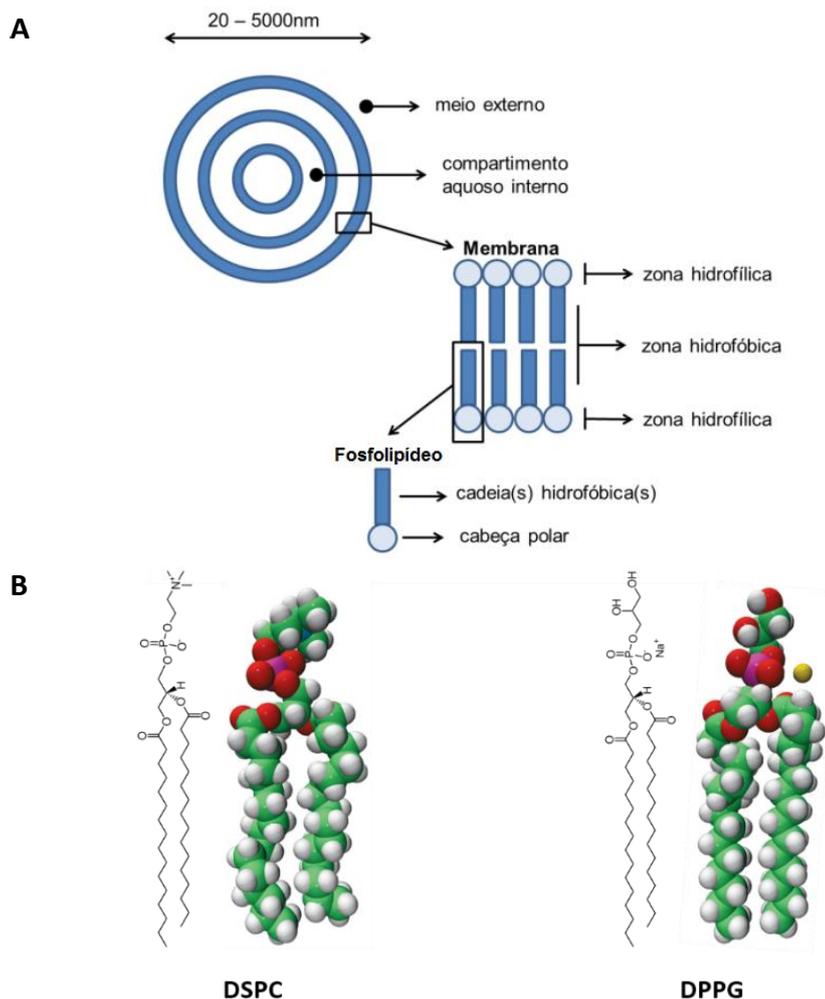


Figura 4. Componentes de formação dos lipossomas. A) Estrutura esquemática dos lipossomas. (De Souza, 2013). **B)** Estrutura molecular dos fosfolípidios diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) (adaptado de Avanti Polar Lipids, Inc.).

Em trabalhos anteriores, pesquisadores observaram que o diâmetro (nm) dos lipossomas poderia influenciar em seu comportamento (Bozzuto & Molinari, 2015). Lipossomas de menores diâmetros (100-200nm) interagem menos com proteínas do plasma e evitavam a sua captura por células do SMF, levando a uma meia-vida mais longa no sangue. Já os lipossomas maiores (>300nm) tendiam a serem mais capturados pelo SMF e serem eliminados mais rapidamente da circulação (Bozzuto & Molinari, 2015).

O IP é um parâmetro usado para indicar como é a distribuição do diâmetro das vesículas lipossomais e define a homogeneidade da formulação desenvolvida, podendo variar de 0,0 (completamente monodisperso) a 1,0 (completamente polidisperso), sendo desejado que esteja sempre mais próximo de 0,0 (Carmo, 2007; Balest, 2013).

Já o PZ (mV) é obtido a partir uma técnica que visa caracterizar a carga superficial dos lipossomas (Legrand et al., 1999). Um lipossoma pode possuir componentes carregados que poderão conferir carga neutra, positiva ou negativa. A carga neutra pode levar a agregação dos lipossomas o que reduziria sua estabilidade física o que, conseqüentemente prejudicaria sua ação (Bozzuto & Molinari, 2015). Além disso, o caráter neutro das partículas faz com que não ocorra interação significativa com as células, levando à liberação dos fármacos no meio extracelular (Bozzuto & Molinari, 2015). Já a presença de uma carga na superfície, positiva ou negativa, induz repulsão eletrostática entre lipossomas, prevenindo a agregação e colisões com partículas adjacentes, e, diferente das partículas neutras, uma alta carga tende a auxiliar na melhor interação com as células, quanto maior o seu valor, positivo ou negativo, maior a estabilidade da formulação (Balest, 2013; Bozzuto & Molinari, 2015).

Baseado no potencial de incremento dos lipossomas à ação dos fármacos atuais e seu auxílio na redução da toxicidade, optamos por adicionar a técnica no preparo de nosso composto.

2. JUSTIFICATIVA

Levando em consideração os muitos desafios e dificuldades encontradas no tratamento da leishmaniose visceral, como os citados acima, esse trabalho teve como foco a busca por um novo fármaco que auxiliasse no tratamento dessa doença de grande importância médica e veterinária, a partir da elaboração de uma formulação lipossomal contendo, em sua estrutura, uma molécula com ação leishmanicida.

3. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de nova formulação lipossomal contendo uma molécula derivada da hederagenina e a avaliação da eficácia dessa formulação na inibição do crescimento parasitário das formas intracelulares de *Leishmania infantum* em modelos *in vitro* e *in vivo*.

3.1. Objetivos específicos

- i. Elaborar uma formulação Lipossomal com uma molécula derivada da hederagenina incorporado à sua estrutura (FL-DHe)
- ii. Realizar a caracterização físico-química dos sistemas lipossomais em termos de diâmetro (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) das formulações desenvolvidas.
- iii. Avaliar a eficácia *in vitro* na redução da carga parasitária das formas intracelulares de *L. infantum* utilizando macrófagos da linhagem DH82 infectados.
- iv. Verificar a viabilidade metabólica de células expostas à formulação FL-DHe por ensaio colorimétrico MTT.
- v. Avaliar a toxicidade FL-DHe, em modelo murino, utilizando técnicas de análises histopatológicas e bioquímicas.
- vi. Avaliar a atividade leishmanicida em modelo murino infectado com *L. infantum*, utilizando PCR em tempo real para quantificação da carga parasitária pós tratamento.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção dos materiais

4.1.1. Obtenção do derivado da Hederagenina (DHe)

O composto 49 citado na tabela 1, foi selecionado como o mais promissor para ser utilizado nos testes. O processo de obtenção da He foi realizado por colaboradores do Departamento de Química da UFMG e UFV, e é descrito por Rodríguez-Hernandez et al. (2015;2016ab). No esquema da figura 5 observa-se que, para produção desse derivado, houve a substituição do grupo hidroxila e no local, referente ao carbono 28, foi adicionado uma porção contendo um grupamento amida e um grupo triazol. A molécula foi caracterizada por métodos espectroscópicos e espectrométricos e a descrição de sua atividade leishmanicida é mostrada na tabela 1. A molécula foi nomeada, neste trabalho, como 'Derivada da Hederagenina' (DHe) (Rodríguez-Hernandez et al., 2016a).

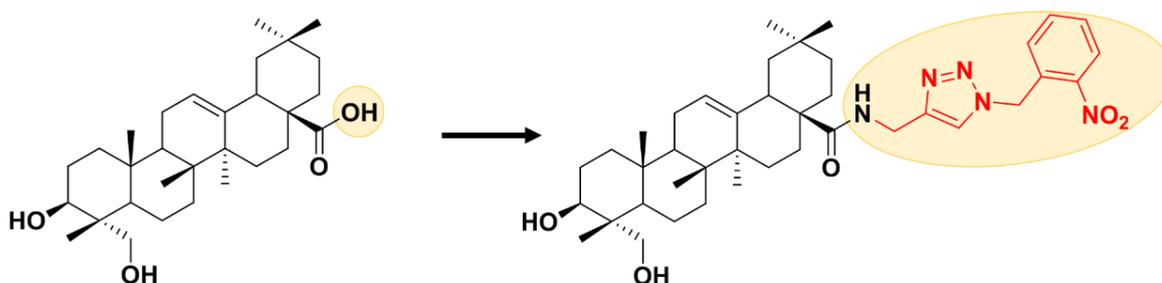


Figura 5. Esquema de obtenção do derivado da hederagenina utilizado nos testes (Adaptada de Rodríguez-Hernandez et al. 2015;2016a).

4.1.2. Formulação Lipossomal e Caracterização

As formulações, na forma liofilizada, foram fornecidas em colaboração com o Prof. Dr. Frédéric Frezárd e pelo doutorando Guilherme Ramos, ambos integrantes do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG.

Para o preparo dos lipossomas foram utilizados os fosfolípidos diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) com ou sem o fármaco FL-DHe na razão molar de 5:0,5:0,5, respectivamente (Figura 6-A). Para tal preparo utilizamos o método de desidratação – reidratação como descrito previamente (Kirby & Gregoriadis 1984) demonstrado na figura 6-B.

Sucintamente, os fosfolipídeos/fármaco supracitados foram solubilizados em uma mistura clorofórmio/metanol (2:1) em um balão de fundo redondo que posteriormente foi levado a um evaporador rotativo parcialmente imerso em banho à 60°C para formação do filme lipídico e evaporação do solvente por 60 minutos, sob vácuo constante. Em seguida, este filme foi hidratado com solução de sacarose 0,4M por 60 minutos à 60°C, sem vácuo. Posteriormente, as vesículas foram submetidas a um processo de calibração de tamanho por filtração repetida (5x) a 60°C, através de membrana de policarbonato com poro de 200 e 100 nm (Sigma, Whatman® Nuclepore™, Alemanha), usando uma extrusora acoplada a um gás inerte (nitrogênio ou argônio).

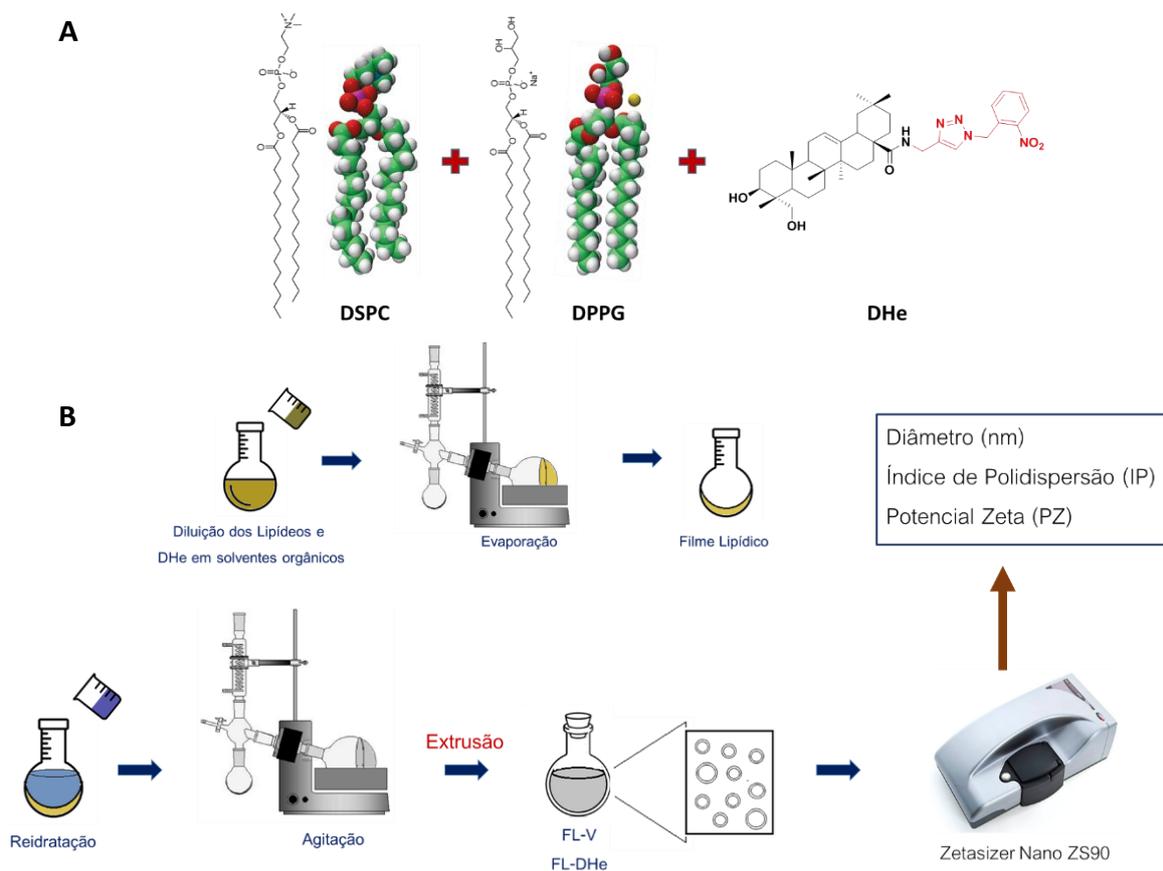


Figura 6. Preparo de formulação Lipossomal contendo o fármaco (FL-DHe) e somente com os fosfolipídeos (FL-V). A) Fosfolipídeos e molécula DHe utilizados no preparo dos lipossomas contendo o fármaco. Em formulações vazias são utilizados os mesmos fosfolipídeos sem a DHe. **B)** Esquema de preparo do filme lipídico. Imagem criada a partir da adaptação do protocolo de Kirby & Gregoriadis 1984.

Alíquotas dos lipossomas calibrados foram utilizadas para análises de tamanho e do índice de polidispersão (IP), ambas através de espectroscopia de correlação de fótons (DLS -Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments LTD, Reino

Unido), a 25°C com ângulo de espalhamento de 90°. O potencial zeta (PZ) foi avaliado também por DLS associado à mobilidade eletroforética, a um ângulo de 90°. Para as análises, usou-se 0,01mL da amostra (formulação) para 0,99mL de diluente.

A formulação lipossomal que possuíam o composto encapsulado em sua estrutura foi denominada FL-DHe e a que possuía somente os lipídeos FL-V. Ambas as amostras foram então congeladas em nitrogênio líquido, liofilizados por até 48hs e armazenados em -20°C até o uso.

4.1.3. Promastigotas de *Leishmania infantum* da cepa MHOM/BR/1974/PP75

As formas promastigotas em fase estacionária de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) foram cultivadas em meio Schneider (Schneider's Insect Medium) contendo antibiótico (100U/mL de penicilina; 100µg/mL de estreptomicina - Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA), 10% de soro fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA) inativado e foram mantidas a 26 °C em incubadora Biochemical Oxygen Demand (BOD - Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA) até que estivessem na fase estacionária, mantendo as formas em cultura somente até a décima passagem.

4.1.4. Linhagens celulares

Linhagens de células de rim de macaco (BGM), hepatoma humano (HepG2) e macrófagos de cão (DH82) foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI – Merck, Alemanha) contendo antibiótico (100U/mL de penicilina; 100µg/mL de estreptomicina - Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA), 10% de soro fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA) e foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ em incubadora BOD (Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA)

4.1.5. Camundongos

Para os experimentos, foram utilizados camundongos fêmeas (*Mus musculus*) Balb/c, com aproximadamente 8 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante o período experimental, os camundongos foram alimentados com água filtrada e ração comercial (Nuvilab Cr-1, Nuvital Nutrients, Brasil) *ad libitum* aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UFMG, sob o protocolo nº 45/2012.

4.2. Avaliação da formulação lipossomal sobre o crescimento *in vitro* de formas amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum*

A atividade *in vitro* dos compostos contra amastigotas intracelulares de *L. infantum* (PP75) foi realizada usando macrófago DH82. As análises foram divididas em 3 grupos de tratamento: Formulação Lipossomal contendo derivado da hederagenina (FL-DHe), Formulação lipossomal vazia (FL-V) e o controle positivo utilizando a Anfotericina B (AmB).

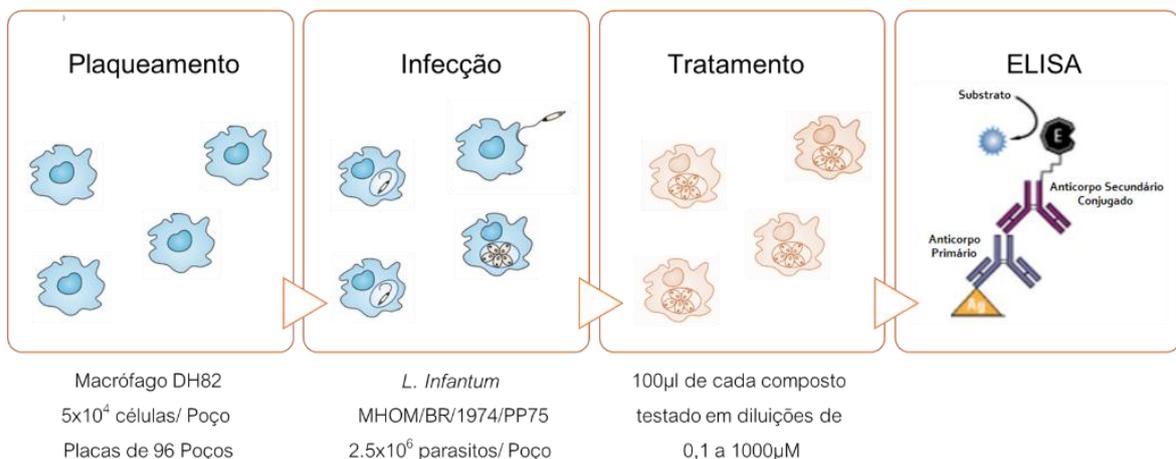


Figura 7. Esquema de tratamento das células infectadas com *L. infantum*

Os macrófagos foram contados com auxílio de uma câmara de Neubauer, plaqueados a uma concentração 5x10⁴ macrófagos por poço em placas de poliestireno de 96 poços (Cell Wells, Corning Glass Works, EUA), como descrito no esquema da figura 7, e incubadas a 37°C, e 5% CO₂ em estufa BOD (Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA) (Maia et al., 2007). Após 24h, o sobrenadante foi removido e os macrófagos aderidos foram infectados com promastigotas de PP75 em fase estacionária, em uma proporção de 50 parasitos para cada célula hospedeira. Quatro horas após a infecção, as culturas foram lavadas três vezes com Tampão fosfato salino (PBS), para remover os parasitos extracelulares e, logo em seguida, os compostos diluídos em meio RPMI completo foram adicionados aos poços nas seguintes concentrações: 0,01; 1, 10, 100 e 1000µM para a FL-DHe e para a AmB, e a concentração de FL-V foi baseada nos mesmo volumes calculados em FL-DHe, para se obter a mesma quantidade de lipídeos adicionados aos poços. Todos os compostos foram testados em quatro replicatas para cada concentração.

Após 48hs, as culturas foram fixadas com 100µl de metanol gelado, durante 15 min e secas com ar quente. Após esse processo foi realizado o ensaio ELISA onde a redução da carga será avaliada de acordo com o sinal de absorbância obtido nesse ensaio que será descrito no próximo subitem.

4.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Para verificar a eficácia do tratamento no modelo *in vivo* foi desenvolvido o ensaio imunoabsorção enzimática, ELISA, que visa auxiliar a identificar a carga parasitária de acordo com os valores de absorbância obtidos.

Após a fixação descrita no subitem anterior, as placas foram lavadas três vezes com 100µL de PBS contendo BSA (Bovine Serum Albumin - Merck, Alemanha) a 5% e, para bloquear possíveis ligações não específicas do anticorpo com o substrato, incubou-se durante 1h a 37°C com esta mesma solução. Ao término desse intervalo, foi retirada a solução de bloqueio e adicionado à metade superior da placa soro de paciente infectado com *Leishmania* sp. (diluição 1:360) e à outra metade soro de paciente não infectado na mesma diluição, seguido de incubação por mais 1 h a 37°C. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (pH 7,3). Em seguida, 100µl de anticorpo, Anti-IgG conjugado com enzima peroxidase (Sigma-Aldrich, USA), foram adicionados a todos os poços (diluição 1:2000). As placas foram novamente incubadas durante 1h a 37°C, e, posteriormente re-lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (pH 7,3) antes de desenvolver a reação de revelação. Para desenvolvimento da reação, 100µL de solução de substrato {Por placa: 10mL de tampão de citrato [(ácido cítrico 0,1M; Na₂PO₄ 0,2M); ,10mg de *orto*-fenilenodiamina (OPD – Sigma Aldrich, EUA) e 10µl de H₂O₂ (Synth, Brasil)]} foi adicionado a cada poço e as placas ficaram incubadas a 37 °C. Após 15 min, a reação foi parada pela adição de 30µl da solução ácido sulfúrico 4N (H₂SO₄) e a leitura da densidade óptica (DO) foi medida a 492nm em um leitor de ELISA (Versamax, Molecular Devices, EUA).

Os valores de concentração inibitória de 50% da multiplicação das amastigotas (IC₅₀) foram calculados como se segue: primeiro, a influência do fundo placa (background) e da ligação de anticorpos não específicos para amastigotas de *Leishmania* sp. foram corrigidos. Para corrigir essa ligação inespecífica dos anticorpos, subtraiu-se dos macrófagos infectados com amastigotas de *L. infantum*

e incubados com soro de paciente positivo a média da densidade óptica (DO_{492nm}) de macrófagos infectados, porém incubados com soro de pacientes negativos para *Leishmania* spp. Os resultados *in vitro* de atividade foram expressos como índice de inibição de crescimento (INDEX) em relação aos controles de macrófagos infectados com amastigotas e não-tratados (adaptado de Nilubol et al., 2012), considerando: $INDEX = (DO_{492nm} \text{ poços experimentais} / DO_{492nm} \text{ controles não tratados}) \times 100$.

Para determinar a atividade do composto, os dados de resposta de índice foram representados graficamente e modelados por uma curva de dose-resposta com base em quatro parâmetros de ajuste logístico (Nilubol et al., 2012). O valor de IC_{50} referente ao crescimento do parasito foi determinado como a concentração do composto capaz de reduzir em 50% o crescimento das amastigotas de *L. infantum* (Aulner et al., 2013; Hansen et al., 2010), e, para isso, utilizou-se o programa estatístico software GraphPadPrism 8 (GraphPad Inc, EUA).

4.4. Ensaio de viabilidade metabólica (MTT)

Com intuito de avaliar a citotoxicidade da FL-DHe e da AmB, foi realizado o teste de viabilidade metabólica utilizando brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio (MTT - Merck, Alemanha). Esse método se baseia na dosagem da atividade metabólica de células viáveis utilizando o ensaio colorimétrico. O protocolo foi adaptado a partir de métodos previamente descritos (Maia et al., 2007; Hansen et al., 2010).

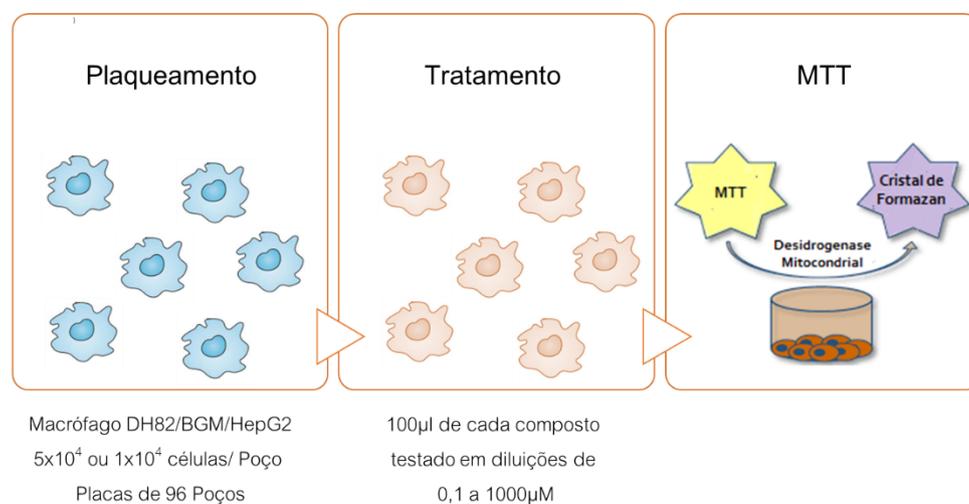


Figura 8. Esquema de teste de viabilidade celular

As células de BGM e HepG2 foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 por poço enquanto DH82 plaqueados a 5×10^4 células por poço, como demonstrado no esquema da figura 8. Poços sem células foram utilizados como controles em branco onde foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO - Merck, Alemanha) à 0,1% e poços com células não tratadas foram usados como controle positivo.

Para a análise, 100µl dos compostos diluídos foram adicionados aos seus respectivos poços contendo já as células plaqueadas com as mesmas concentrações utilizadas nos testes de atividade, e as placas foram incubadas durante 48hs, a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Todos os compostos foram adicionados, também, em alguns dos poços vazios restante para verificar se, isoladamente, poderiam apresentar ação redutora do MTT. Após o período de incubação, 10µL de MTT (5 mg/mL de solução) foram adicionados à cada poço e a placa foi incubada por mais 4h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os cristais de Formazan, o produto metabólico de MTT, do fundo dos poços foi ressuspendido em 50µl de DMSO. A intensidade colorimétrica foi medida por densidade óptica a 570nm em um leitor de ELISA (Versamax, Molecular Devices, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade. Os valores da viabilidade foram utilizados para calcular valores de CC₅₀, obtidos por análise de regressão no programa estatístico software GraphPadPrism 8.0.

4.5. Esquema de tratamento para avaliação da toxicidade em modelo animal

Para verificar a toxicidade da FL-DHe e a dose que seria utilizada nos testes de atividade *in vivo*, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c e seguido o delineamento presente no esquema da figura 9. As doses escolhidas foram baseadas no protocolo aplicado no uso da Anfotericina B lipossomal, que varia de 3 a 4mg/kg/dia. Optamos por adaptar o protocolo terapêutico e variar a dosagem entre 0,03 a 33mg/kg/dia, visando abranger maiores valores já que o comportamento da FL-DHe não, obrigatoriamente, seria o mesmo da AmB lipossomal. Os animais foram separados em 6 grupos para o teste e receberam as doses intraperitoneais em dias alternados completando 7 doses em 15 dias, como descrito no esquema (Figura 9-A e 9-B). O grupo PBS recebeu solução salina e o grupo FL-V recebeu o mesmo volume de fosfolípídeos correspondente à dose do

grupo de 33mg/kg. Já os outros 4 grupos receberam diferentes concentrações de FL-DHe variando de 0,03 a 33mg/kg do fármaco encapsulado por animal.

Os animais foram eutanasiados 48hs após a última dose do tratamento (dia 15) utilizando uma superdosagem de anestésico (Solução de Cloridrato Xilazina 2% Ceva, Brasil; Cloridrato de Cetamina 10% Syntec, Brasil) para a coleta de sangue, fígado e rim. O sangue foi centrifugado (1500g por 10 min) e o soro coletado foi armazenado em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas.

O fígado e baço coletados foram imersos em formol para fixação. Após o período de fixação no formol, um fragmento de cada órgão foi desidratado em diluições alcólicas crescentes, diafanizados em xilol, infiltrado e incluído em parafina. Foram obtidos cortes com 4µm de espessura para coloração com hematoxilina e eosina (H&E), e confeccionadas lâminas para análises histopatológica e semiquantitativas.

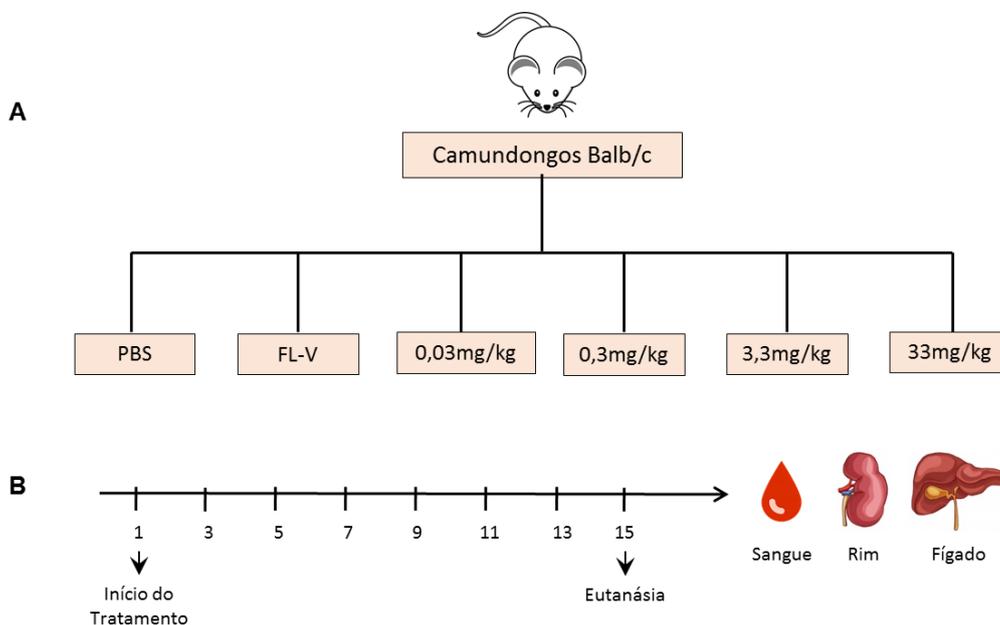


Figura 9. Delineamento do teste de toxicidade de FL-DHe em modelo animal A) Divisão de grupos de tratamento experimental. **B)** Esquema de administração dos compostos com a descrição das amostras coletadas

4.6. Análises histopatológica e semiquantitativa das lesões hepáticas e renais

As lâminas descritas no subitem 4.5, foram confeccionadas em colaboração com o professor Dr. Marcelo Caliari do Departamento de Patologia da UFMG.

As análises histopatológicas das lâminas foram utilizadas para avaliar a presença de possíveis lesões provenientes do tratamento dos animais com as

diferentes concentrações de FL-DHe e FL-V. As lesões exibidas no fígado e rim, quando presentes, foram caracterizadas em relação a presença de infiltrado inflamatório e topografia.

Para análises semiquantitativas, as lâminas foram examinadas por microscopista experiente, em microscópio óptico de campo claro acoplado a um sistema de captura digital de Imagem (Motic 2.0). Para o score da inflamação do parênquima renal foram capturadas 10 imagens aleatórias por animal com aumento de 20X. O score, baseado em protocolo de Brunt (2000) é classificado em 4 graus para inflamação do parênquima renal sendo: grau 0, ausência de células inflamatórias (ausente); grau 1 alguns glomérulos e ou túbulos renais possuíam um pequeno número de células inflamatórias (discreto); grau 2, glomérulos e ou túbulos renais possuíam em inflamação significativa (moderada); grau 3, a maioria glomérulos e ou túbulos renais possuíam intenso infiltrado inflamatório (acentuada).

Para o score das lesões hepáticas foram capturadas 20 imagens aleatórias por animal com aumento de 20X. O score também foi em protocolo de Brunt (2000) e classificado em 4 graus para lesão do parênquima hepático: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno dos hepatócitos, vasos sanguíneos, ductos biliares e capilares (ausente); grau 1 regiões do parênquima hepático possuíam um pequeno número de células inflamatórias (discreto); grau 2 o parênquima hepático apresentava infiltrado inflamatório difuso e infiltrado inflamatório perivascular, em torno dos ductos e pequenas zonas de necrose dispersas pelo parênquima (moderada); grau 3 parênquima hepático apresentava infiltrado inflamatório difuso e infiltrado inflamatório perivascular, em torno dos ductos e extensas zonas de necrose dispersas pelo parênquima (acentuada).

A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição normal dos dados os testes Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk foram aplicados, verificando, também, a presença de possíveis outliers. Para as análises de variância foram realizados os testes One-Way ANOVA em dados paramétricos, seguindo de teste Turkey ou em caso dos não paramétricos, foi usado Kruskal-wallis e teste de Dunns. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram valor de $p \leq 0,05$.

4.7. Análises bioquímicas

As análises foram realizadas em parceria com a professora Dr^a Fabíola Paes Leme do laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFMG.

Como parâmetro de lesão renal foram avaliados os níveis de Ureia e creatinina em mg/dl usando Kit comercial da Kovalent (Kovalent do Brasil Ltda). Os reagentes foram adicionados, junto às amostras, ao equipamento de análises bioquímicas Cobas Mira Plus (Roche Diagnostic Systems, Suíça), que realizou todo o processamento das amostras. A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição normal dos dados os testes Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk foram aplicados, verificando, também, a presença de possíveis outliers. Para as análises de variância foram realizados os testes One-Way ANOVA em dados paramétricos, seguindo de teste Turkey ou em caso dos não paramétricos, foi usado Kruskal-wallis e teste de Dunns. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram valor de $p \leq 0,05$.

Já as avaliações de lesão hepatocelular foram determinadas medido a concentração de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) usando uma adaptação dos kits comerciais da Bioclin (Bioclin Quibasa, Brasil) das duas enzimas. O volume de plasma empregado foi 10 μ L para cada ensaio. Os dados obtidos passaram foram analisados utilizando o GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc, EUA) seguindo os mesmos parâmetros já citados.

4.8. Avaliação de atividade leishmanicida de FL-DHe *in vivo*

Para avaliar a eficácia da FL-DHe em modelo murino, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, com aproximadamente 8 semanas de vida, que foram divididas em três grupos, descritos no esquema da figura 10.

O grupo não tratado com formulações (NT), o grupo que seria tratado com FL-DHe (33mg/kg) e o grupo que seria tratado com FL-V receberam, via intraperitoneal, 100 μ l de solução salina contendo 1×10^7 parasitos.

Antes do início do tratamento, alguns animais foram eutanasiados, 60 dias após a infecção, para avaliação da carga, por técnica de PCR e o tratamento teve início após confirmação da infecção. Os animais do grupo FL-DHe foram tratados, via intraperitoneal, com doses que foram administradas nos dias 0, 4 e 8 e o grupo FL-

V também foi tratado por via intraperitoneal utilizando uma dose, com volume de fosfolípidos correspondente à dose administrada de FL-DHe, durante os mesmos dias, como descrito na figura 10. No grupo NT foi administrado 100µl de PBS nos mesmos períodos.

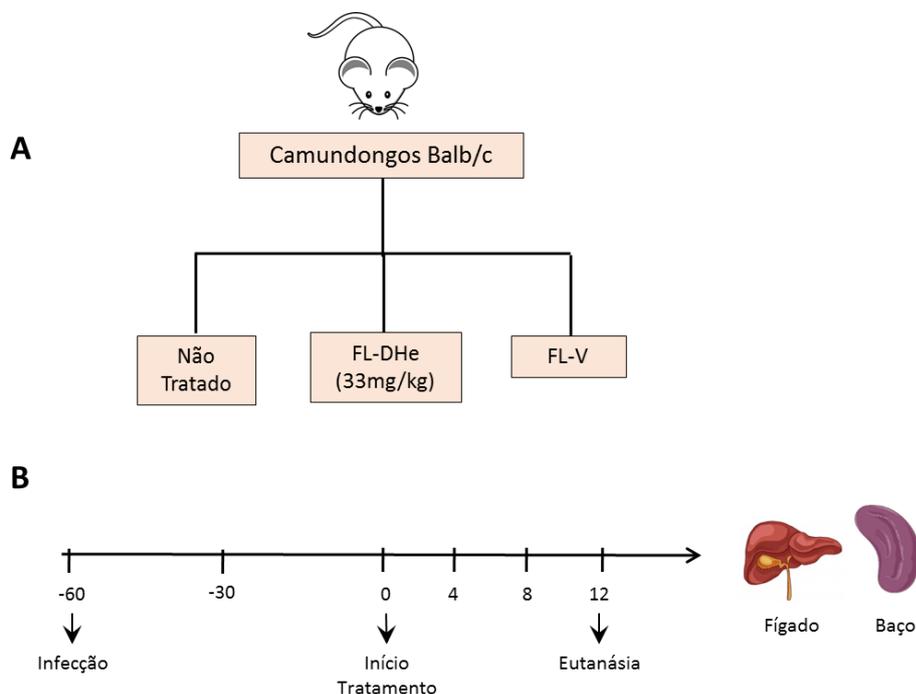


Figura 10. Delineamento do teste de atividade leishmanicida de FL-DHe em modelo animal. A) Separação dos grupos infectados em Não tratados (NT), tratados (FL-DHe) e tratados com formulação vazia (FL-V). **B)** Esquema de infecção e dias de tratamento até a eutanásia.

No quarto dia após a aplicação da última dose, os animais foram eutanasiados utilizando superdosagem de anestésico (Solução de Cloridrato Xilazina 2% Ceva, Brasil; Cloridrato de Cetamina 10% Syntec, Brasil) para a coleta do fígado e baço. Os órgãos coletados foram picotados com auxílio de bisturi e, com auxílio do próprio bisturi, o material foi homogeneizado e armazenado em tubos eppendorf no freezer -80°C até a data de sua utilização.

4.9.Extração de DNA

Para o procedimento de extração, foram pesados 25mg de cada amostra coletada (subitem 4.8) e, em seguida, o DNA foi extraído utilizando o protocolo do fabricante do kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Duren, Germany) e os seus componentes. O DNA proveniente da extração foi eluído em água ultrapura estéril e quantificado em espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c. Todas as amostras foram então diluídas para a concentração de 20ng/µl de DNA e o material foi armazenado em freezer -80°C até a data do seu processamento via

PCR em tempo real para verificar a carga parasitária de cada amostra, o que será descrito no subitem 4.10.

4.10. PCR em tempo real

A fim de se quantificar a carga parasitária dos animais infectados com PP75 e tratados com PBS, FL-DHe e FL-V, foi preparado um mix contendo 5µl de Sybr (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix), 1µl de Primer *L. infantum* DNA polimerase (Forward: 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3', Reverse: 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3', 10µM) e 4µL de água ultrapura estéril.

As reações foram distribuídas em placas (Applied Biosystems N8010560 Microamp Optical 96 Well). Cada poço recebeu o volume final de 10µl, sendo 9µl do mix acrescido de 1µl de DNA (20ng/µl), a placa foi então selada utilizando MicroAmp™ Optical Adhesive Film e centrifugada à 300xg por 5 minutos na temperatura ambiente.

Em seguida as placas foram colocadas no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Systems, EUA), com a seguinte programação de ciclos descrito na tabela 2. A análise do PCR em tempo real foi realizada pelo 7500 software v2.0.1 (Thermo Fisher, EUA) e os resultados foram determinados segundo o método de curva-padrão que foram construídas a partir da diluição seriada do DNA extraído de 10⁸ promastigotas de *L. infantum*.

Tabela 2. Programação de Ciclos para técnica de PRC em tempo real

Pré-desnaturação	Desnaturação (40 ciclos)	Anelamento/extensão
50°C, 2 min. 95°C, 10 min.	95°C, 15 seg.	60°C, 1 min.

A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição dos dados foi utilizado testes como Kolmogorov-Smirnov, one-way ANOVA, entre outros, a fim de verificar a diferença entre os grupos NT, FL-DHe e FL-V. As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Formulação lipossomal e caracterização

Os lipossomas produzidos e liofilizados, foram então reidratados com água deionizada, a temperatura de 60°C por 5 minutos sob agitação mecânica. Alíquotas das suspensões finais de lipossomas foram utilizadas para avaliação de seu diâmetro, IP e PZ conforme citado anteriormente. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3. Distribuição de diâmetro, IP e PZ das partículas das formulações de FL-V e FL-DHe

Amostra	Diâmetro (nm)	IP	PZ (mV)
FL-V	104,8±12	0,09±0,02	-21±2,1
FL-DHe	138,4±21	0,12±0,1	-19,5±1,9

FL-V: Formulação Lipossomal Vazia. **FL-DHe:** Formulação Lipossomal contendo derivado da hederagenina. **IP:** Índice de Polidispersão. **PZ:** Potencial Zeta. Representadas médias e desvio padrão (\pm).

Os parâmetros apresentados na tabela 3 foram obtidos a partir da avaliação das características das duas formulações preparadas. Para a FL-V obtivemos os valores médios de 104nm, IP de 0,09 e PZ de -21mV. Os valores médios da FL-DHe foram de 138nm, IP de 0,12 e PZ de -19mV. Os resultados das análises foram atingidos após três medições independentes de cada parâmetro, estando ambas as formulações aptas a seguirem nos testes.

5.2. Análise da atividade da FL-DHe *in vitro*.

A avaliação da atividade *in vitro* da FL-DHe e da FL-V foi realizada sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* (PP75) parasitando macrófagos (DH82) e, como controle positivo foi utilizado a AmB convencional.

Todos estes valores IC₅₀ calculados foram obtidos a partir de experimentos com quatro réplicas. Na figura 11 é demonstrada a curva dose-resposta sigmoideal log [substância] versus a percentagem de inibição das formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* da atividade da FL-DHe e seus respectivos valores de IC₅₀.

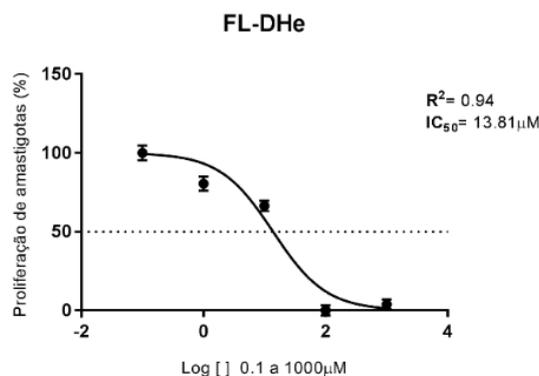


Figura 11. Curva dose-resposta de FL-DHe. FL-DHe: Formulação Lipossomal contendo derivado da hederagenina. r^2 : Coeficiente de variação. IC_{50} : Concentração requerida para inibir 50% da proliferação

Após realização do ensaio foram obtidos os valores de IC_{50} apresentados na tabela 4. A partir dos dados foi possível verificar que a formulação apresentou atividade leishmanicida, com valor de IC_{50} de $13\mu M$, ou seja, com apenas $13\mu M$ já foi possível observar uma inibição de 50% das formas amastigotas. Já o controle positivo, AmB, apresentou uma atividade um pouco menos eficiente, com valores de IC_{50} de $17\mu M$. Os valores do coeficiente de variação (r^2), que definem a confiabilidade dos resultados (Varia de 0-1), foram maiores do que 0,8 nos testes com FL-DHe e com AmB. Já os valores da formulação FL-V não se adequaram à curva ($r^2 < 0,8$) desta forma, foi considerada sem apresentar atividade.

Tabela 4. Resultados das análises de atividade *in vitro* de FL-DHe

Composto	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM) MΦ	IS	CC_{50} (μM) BGM	CC_{50} (μM) Hep G2
FL-DHe	$13 \pm 0,07$	$110 \pm 0,06$	8,46	>1000	$92 \pm 0,26$
AmB	$17 \pm 0,13$	$23 \pm 0,05$	1,35	$13 \pm 0,06$	$9 \pm 0,05$

FL-DHe: Formulação Lipossomal contendo derivado da hederagenina. IC_{50} : Concentração requerida para inibir 50% da proliferação de amastigotas. CC_{50} : Concentração de citotoxicidade do fármaco que resulta em 50% da mortalidade celular. **IS:** Índice de Seletividade. **MΦ:** Macrófagos Caninos DH82. **BGM:** Células de Rim de Macaco Verde. **HEPG2:** Células derivadas de hepatoma humano

5.3. Análise da viabilidade metabólica das células na presença de FL-DHe

A formulação FL-DHe e AmB também foram avaliados por meio do ensaio colorimétrico para verificar a viabilidade metabólica das células expostas a eles. Como formulação FL-V não foi ativa, ela não foi avaliada nesse ensaio.

Os resultados da concentração citotóxica (CC_{50}), concentração de citotoxicidade do fármaco que resulta em 50% da mortalidade celular, são apresentados na Tabela 4. Nos testes de citotoxicidade sobre macrófagos, BGM e HepG2, a FL-DHe obteve bons resultados apresentando baixa toxicidade com os valores de CC_{50} à 110, >1000 e $92\mu\text{M}$, respectivamente. Esses valores mostram que, para que o composto apresente toxicidade com mortalidade de 50% das células, em cultura, ele precisa estar sendo administrado em quantidades iguais ou maiores do que as concentrações relatadas acima. Em contrapartida, os valores de toxicidade sobre os mesmos tipos celulares, obtidos pela AmB se apresentaram com os valores de CC_{50} de $23\mu\text{M}$ para macrófagos, $13\mu\text{M}$ para BGM e $9\mu\text{M}$ para HepG2, apresentando uma toxicidade mais elevada, visto que, uma quantidade menor desse fármaco, em comparação com FL-DHe, já é suficiente para danificar as células. Na tabela 4 também estão demonstrados os índices de seletividade (IS), valores que definem o quanto a ação de um composto é direcionada ao parasito sem causar danos às células dos mamíferos, ou seja, quanto maiores os valores obtidos, mais seletiva será a ação da formulação sobre os parasitos sem danificar as células hospedeiras e, assim, maior a segurança do tratamento. Para obter os valores de IS, foi calculada a razão entre os valores de CC_{50} e os valores de IC_{50} obtidos após os testes de citotoxicidade e atividade, respectivamente.

5.4. Toxicidade em modelo animal

5.4.1. Análises histopatológicas e semiquantitativas

Visando definir uma dose segura que seria utilizada no tratamento, 34 animais foram divididos em 6 grupos, como descrito na figura 9. Após análises histopatológica e semiquantitativas das lâminas confeccionadas com as amostras coletadas, obtivemos os dados representados nos gráficos da figura 12.

Os gráficos da figura 12 e as fotomicrografias presentes nas figuras 14 e 15, referem-se à análise da presença de infiltrado de células inflamatórias no fígado e no rim, respectivamente, dos animais tratados com PBS, FL-V e as diferentes concentrações de FL-DHe. Ambos os gráficos descrevem, quando presente, o score de lesão encontrados a partir de valores que variam de 0 a 3, como descrito no subitem 4.6 da metodologia.

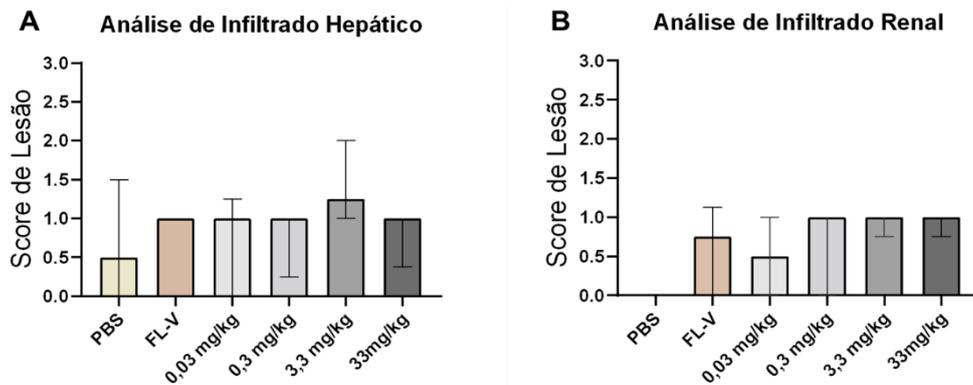


Figura 12. Análises histopatológicas de fígado e rim de camundongos saudáveis após tratamento com PBS, FL-V e diferentes concentrações de FL-DHe. A) Análise de infiltrado inflamatório no tecido hepático. **B)** Análise de infiltrado inflamatório em tecido renal. Score variando de 0-3 (Descrito no subitem 4.6). **PBS:** Tratamento com PBS. **FL-V:** Formulação Lipossomal Vazia. **Doses de FL-DHe:** Formulação Lipossomal contendo derivado da hederagenina administrada nas diluições de **0,03, 0,3, 3,3 e 33 mg/kg**. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%).

No gráfico que descreve a investigação de lesões no fígado (Figura 12-A) e do rim (Figura 12-B) a partir de valores bioquímicos podemos observar que, embora tenham ocorrido algumas oscilações nos valores de score, não houveram diferenças estatísticas entre os grupos tratados com as formulações em comparação ao grupo controle PBS em nenhum dos órgãos avaliados ($p > 0,05$). Essa ausência de lesão pode ser observada, também, na figura 14 (A-F) que mostra os cortes histológicos do fígado e na Figura 15 (A-F) de cortes histológicos do rim. Esses cortes permitiram verificarmos que, embora houvesse por vezes a presença de escassas células inflamatórias próximas a ductos e vasos sanguíneos, o fígado e rim pertencentes aos animais de ambos os grupos, não apresentaram nenhuma lesão e apresentavam aspecto normal do parênquima.

5.4.2. Análises bioquímicas

Com o soro coletado dos animais eutanasiados (subitem 4.5) realizamos a medição dos analitos utilizando kit bioquímico. Os dados são apresentados nos gráficos da figura 13.

No gráfico 13-A, referente os níveis de ureia, nos grupos tratados com as doses de FL-DHe obtiveram como resultados, em ordem crescente de dose administrada (0,03mg/kg a 33mg/kg), os valores médios de 51, 52, 52 e 55mg/dl, enquanto o grupo FL-V apresentou dados médios de 63mg/dl. Ambos os grupos quando comparados à média obtida no soro dos animais controle PBS (53mg/dl) não apresentaram diferenças significativas.

No gráfico 13-B podemos observar que os valores de creatinina dos grupos tratados com FL-DHe ou FL-V também não mostraram valores significativamente distantes dos do grupo PBS (0,40 mg/dl). Como resultado obtivemos as medianas de 0,27, 0,43, 0,27 e 0,23mg/dl respectivos às doses de FL-DHe em ordem crescente de concentração avaliada e 0,35mg/dl no grupo tratado com FL-V.

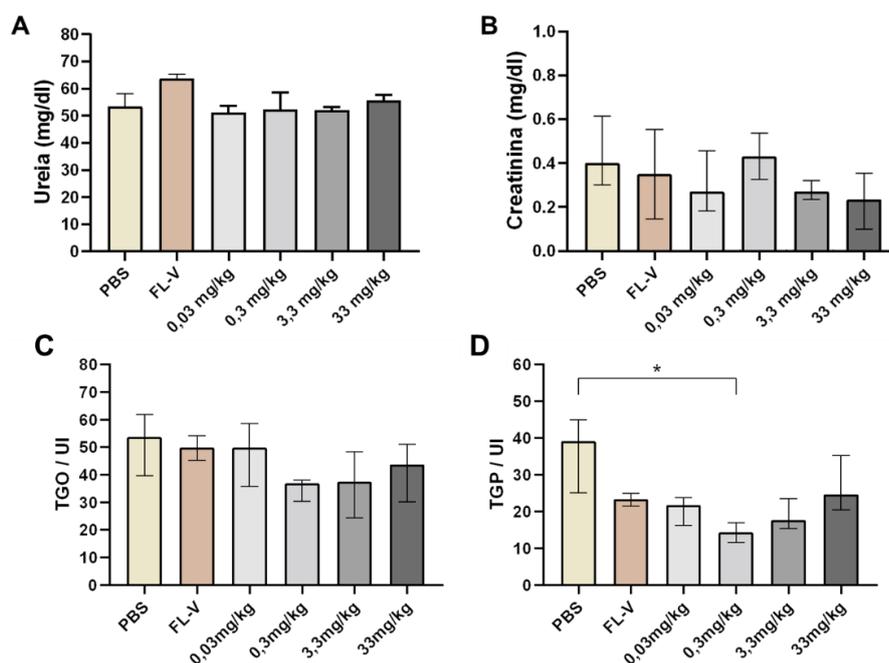


Figura 13. Parâmetros bioquímicos avaliados em animais saudáveis após tratamento com PBS, FL-V e diferentes doses de FL-DHe. A) Níveis de ureia (mg/dl). **B)** Níveis de creatinina (mg/dl). **C)** Níveis de TGO (U/l). **D)** Níveis de TGP (U/l). **PBS:** Tratamento com PBS. **FL-V:** Formulação Lipossomal Vazia. Formulação Lipossomal contendo derivado da hederagenina administrada nas diluições de **0,03, 0,3, 3,3 e 33 mg/kg**. Dados apresentados demonstram a média e desvio padrão da média em A e Mediana e intervalos Interquartil (25%-75%) em B, C e D. (*) $p \leq 0,05$

Já os dados de TGO demonstrados no gráfico 13-C, observamos que os valores dos grupos FL-DHe foram de 49, 36, 37, 43 U/l respectivos às doses da menor para a maior concentração, não apresentando diferenças estatísticas com o grupo FL-V (49U/l) ou o grupo controle PBS (53U/l).

Ao analisarmos os valores de TGP (13-D), obtivemos os valores de 20, 14, 19 e 27 U/l para as respectivas doses de FL-DHe avaliadas em ordem crescente de concentração, além dos valores de 23U/l para FL-V. Quando comparados com o grupo PBS, pôde ser observada diferença estatística somente entre o grupo com dose de 0,03mg/kg de FL-DHe, porem os valores se mantiveram dentro do padrão esperado para animais saudáveis.

Como nenhum dos grupos apresentou toxicidade e lesões significativas em nenhuma das doses testadas, selecionamos a maior dose utilizada para seguir nos testes *in vivo*.

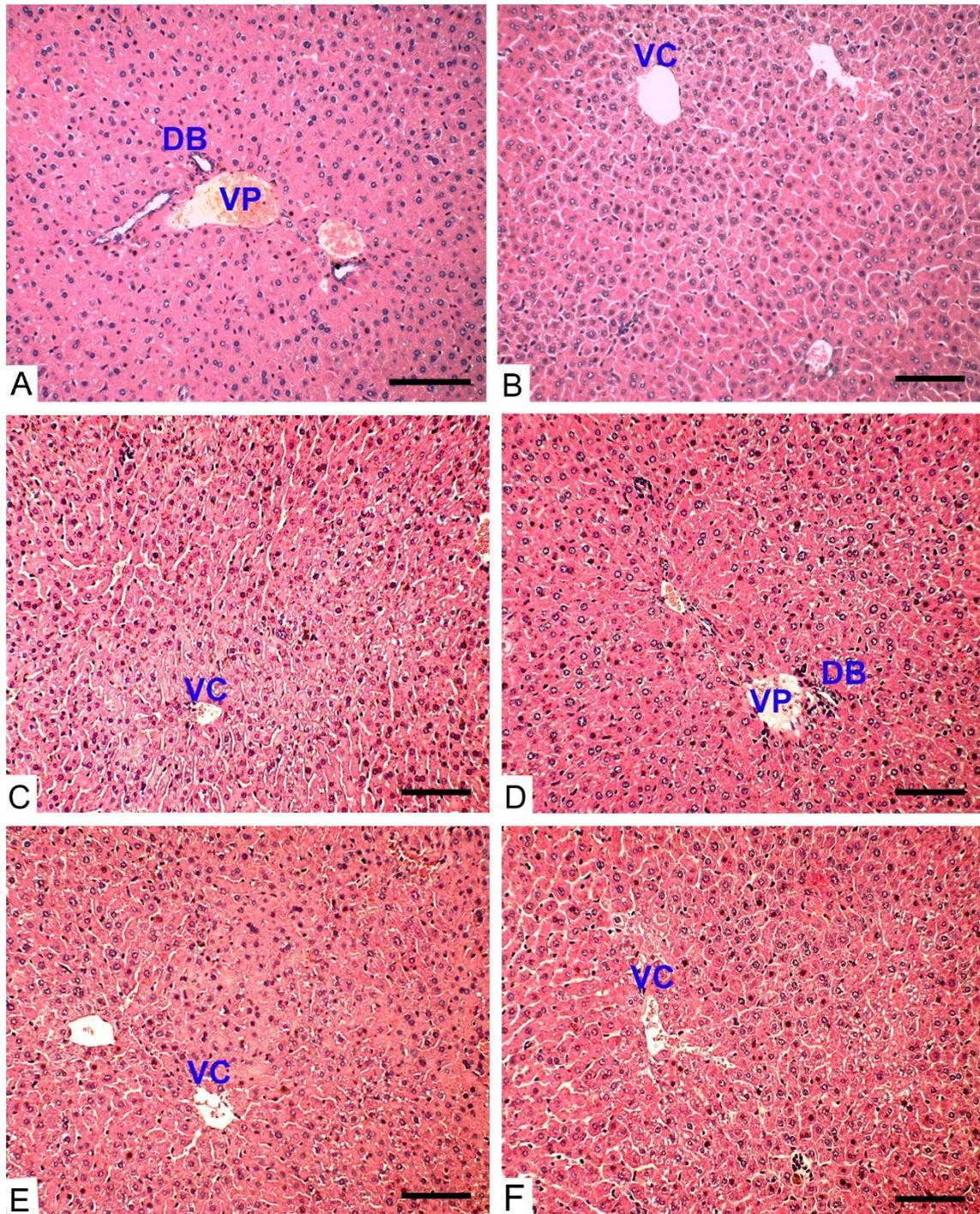


Figura 14. Fotomicrografia de corte histológico do fígado dos animais tratados com PBS, FL-V e diferentes concentrações de FL-DHe. A) Grupo (PBS): parênquima hepático com aspecto normal, [VP] Veia porta, [DB] ducto biliar; **B)** Grupo (FL-V): visível aspecto habitual do parênquima hepático, [VC] veia centrolobular; **C)** Grupo (0,03mg/kg): parênquima hepático com aspecto habitual, [VC] veia centrolobular; **D)** Grupo (0,3mg/kg): visível parênquima hepático com aspecto normal, [VP] Veia porta, [DB] ducto biliar; **E):** Grupo (3,3mg/kg) parênquima hepático com aspecto normal, [VC] veia centrolobular; **F):** Grupo (33mg/kg) parênquima hepático com aspecto normal, [VC] veia centrolobular. Coloração Hematoxilina & Eosina, barra= 100 µm, barra= 200 µm.

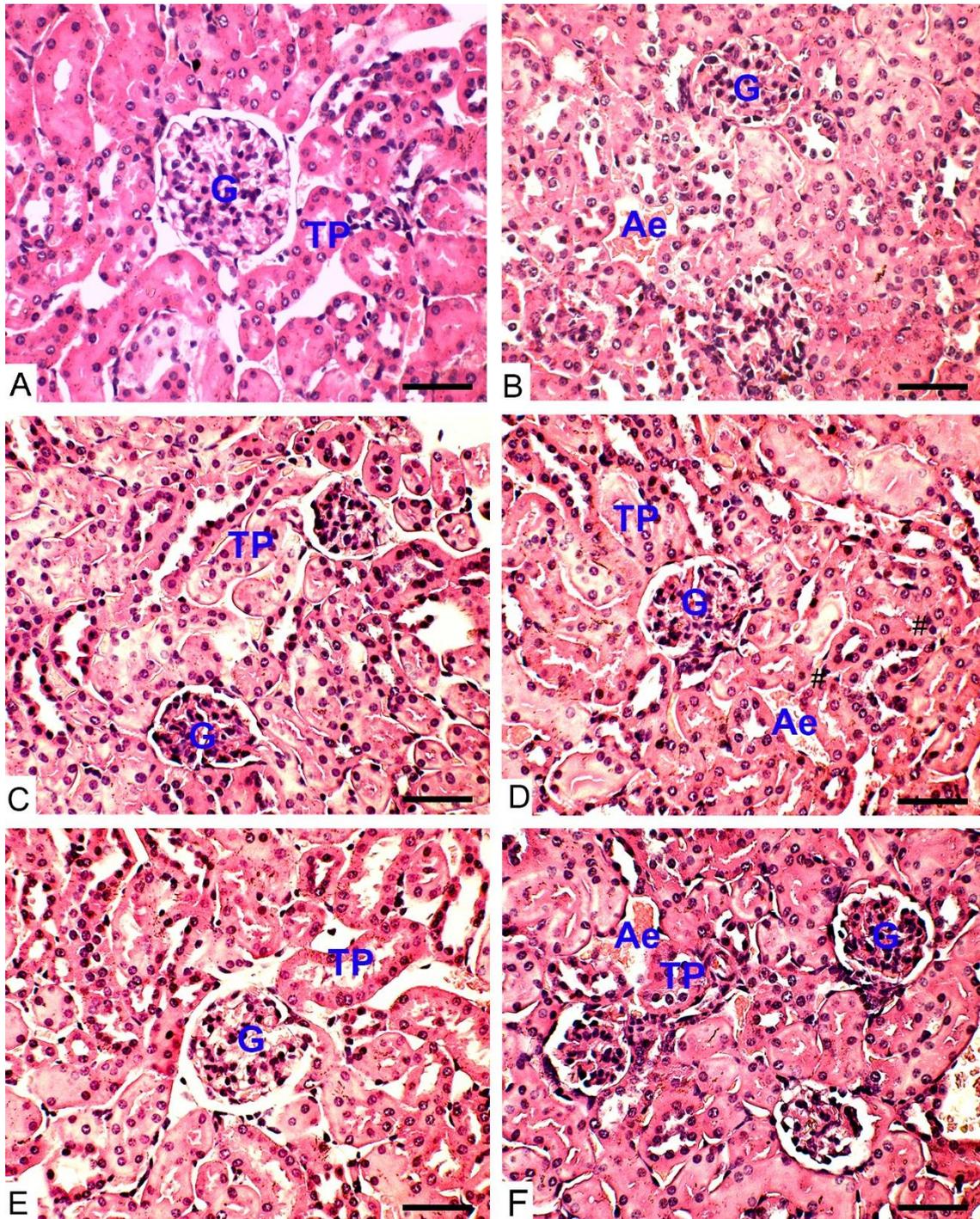


Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico do rim dos animais tratados com PBS, FL-V e diferentes concentrações de FL-DHe. A) Grupo (PBS): parênquima renal com aspecto normal, [G] glomérulo, [TP] túbulo proximal; **B)** Grupo (FL-V): visível aspecto habitual do parênquima renal, [G] glomérulo, [Ae] arteríola aferente; **C)** Grupo (0,03mg/kg): parênquima renal com aspecto habitual, [G] glomérulo, [TP] túbulo proximal; **D)** Grupo (0,3mg/kg): visível parênquima renal com aspecto normal, [G] glomérulo, [TP] túbulo proximal, [Ae] arteríola aferente; **E)** Grupo (3,3mg/kg) parênquima renal com aspecto normal, [G] glomérulo, [TP] túbulo proximal; **F)** Grupo (33mg/kg) parênquima renal com aspecto condizente com a normalidade, [G] glomérulo, [TP] túbulo proximal, [Ae] arteríola aferente. Coloração Hematoxilina & Eosina, barra= 100 µm.

5.5. Testes de avaliação do potencial leishmanicida de FL-DHe *in vivo*

Baseado no resultado das análises de toxicidade *in vivo* descritos no subitem 5.4, a maior dose testada (33mg/kg) foi selecionada para seguir na análise de atividade leishmanicida em modelo murino. Assim, os animais foram tratados, as amostras de fígado e baço foram coletadas e realizou-se os testes por PRC, conforme descrito nos subitens 4.8, 4.9 e 4.10 da metodologia.

A partir de análises de PCR em tempo real (Figura 16), foi possível observar que, após o tratamento, não foi detectada diferença estatística entre os valores de carga encontrada no fígado dos animais dos grupos tratados com FL-V e FL-DHe, em comparação aos animais do grupo NT ($p \geq 0,05$) (Figura 16-A). Já nos valores encontrados no baço de animais tratados (Figura 16-B), pôde ser verificado uma diferença estatística entre os valores do grupo NT e FL-V ($p = 0,02$) e, embora o valor da carga de FL-V tenha sido maior que o apresentado por FL-DHe, não foi observado diferença estatística entre os dois grupos assim como não houve diferenças entre o grupo NT e FL-DHe ($p \geq 0,05$).

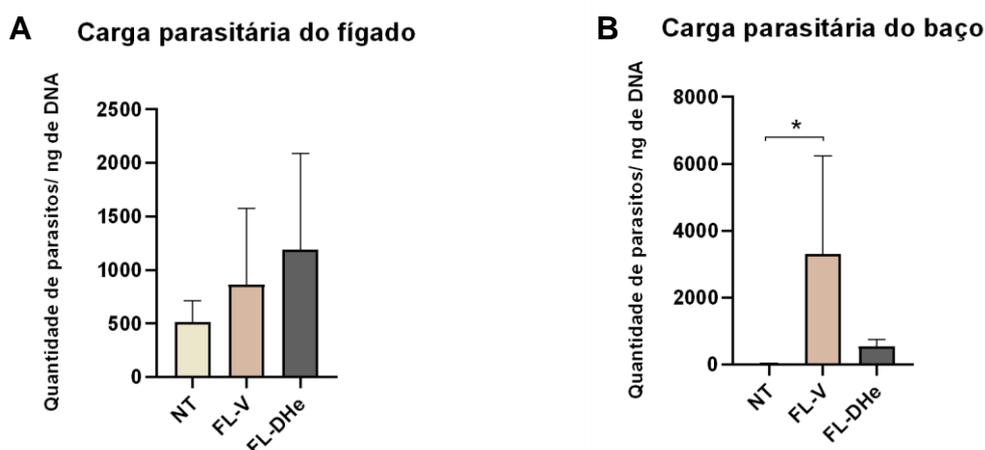


Figura 16. Carga resultante após avaliação do potencial leishmanicida de FL-DHe. Valores obtidos após PCR real time de amostras de fígado de animais infectados: tratados com PBS (NT), tratados com FL-V e tratados com FL-DHe (33mg/kg). **B)** Valores obtidos após PCR real time de amostras de baço de animais infectados: Tratados com PBS (NT), tratados com FL-V e tratados com FL-DHe. (*) $p \leq 0,05$

6. DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças de grande importância médica e veterinária presentes em várias partes do mundo, incluindo países como o Brasil. De acordo o Informe Epidemiológico das Leishmanioses nas Américas divulgado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) em dezembro de 2019, observa-se que o número de casos na América Latina sofreu pequenas reduções nos últimos anos, mas, essas doenças ainda são consideradas umas das principais causas de mortes em países endêmicos (OPAS, 2019).

Embora tenham ocorrido avanços na descoberta de novos fármacos para a terapêutica e tentativas de aprimoramento dos já existentes, as terapias disponíveis para o tratamento da leishmaniose ainda são bastante reduzidas, contando fármacos como a Anfotericina B, Miltefosina e Antimoniato que, além de apresentarem muitos efeitos adversos por causa de sua toxicidade, são caros, têm um longo período de administração, alguns necessitam de grandes dosagens para atingirem a sua eficiência desejada e muitos já apresentam quadros de resistência parasitária (Oryan, 2015). Assim, a busca de novos compostos exige que sejam desenvolvidas terapias com alta seletividade para o parasito e uma menor toxicidade para os pacientes. A descoberta de um tratamento com essas características, poderia levar a uma cura mais rápida, redução na toxicidade e efeitos adversos, redução de casos de recidivas e, também, redução do abandono de pacientes ao tratamento (Machado et al. 2007; Batista et al., 2007; Sundar et al, 2010).

As plantas são uma das ferramentas mais antigas utilizadas na cura e prevenção de doenças (Viégas et al., 2006). Culturalmente observamos o conhecimento da propriedade de várias espécies atravessando gerações e sendo aplicados em pesquisas farmacológicas como ferramentas alternativas à terapias não tão eficazes ou altamente tóxicas (Fabricant & Farnsworth, 2001). Além disso, um único extrato natural pode possuir ampla aplicabilidade pois têm em sua composição, inúmeros compostos químicos que podem ser estudados quanto ao seu comportamento biológico desencadeando diversas fontes de alvos farmacológicos (Sen & Chatterjee, 2011; Bezerra 2020).

Trabalhos realizados com esse foco, vêm selecionando produtos alternativos com resultados promissores para serem utilizados na terapêutica. Pesquisas de

Monzote et al. (2014) com óleos essenciais e outros componentes extraídos de *Chenopodium ambrosioides* demonstraram bons resultados contra amastigotas de *L. amazonensis* com valores de IC₅₀ de 0,3 µg/mL. Já trabalhos de Ghosh et al. (2011), utilizando extratos de *Valeriana wallichii*, evidenciaram uma atividade em torno de 4 µg/mL para formas amastigotas e promastigotas *Leishmania* spp., com resultados um pouco inferiores aos da AmB que ficou abaixo de 1 µg/mL. Entretanto, observou-se que alguns dos compostos testados nesse estudo, não apresentaram nenhuma toxicidade em sua maior concentração de testes (500 µg/mL) o que normalmente não ocorre nos testes utilizando AmB. Em estudos utilizando a Miltefosina como controle positivo, Costa-Silva et al. (2019) utilizando isolados de *Nectandra oppositifolia* obtiveram um bom resultado sob amastigotas de *L. infantum* com IC₅₀ de 10,5µM.

O composto utilizado nesse trabalho foi testado, anteriormente, por nosso grupo de pesquisa, juntamente a outros 59 derivados da hederagenina e ela própria. Ele foi obtido a partir de frutos de *Sapindus saponaria*. A própria hederagenina e de seus 8 derivados apresentaram atividade leishmanicida inibindo a proliferação de amastigotas em macrófagos infectados.

Selecionamos, a partir daí o mais promissor para seguir nos testes farmacológicos, o qual denominamos de DHe. Esse composto selecionado havia apresentado, *in vitro*, resultados de IC₅₀ de 2µM além de baixa toxicidade em todos os tipos celulares testados, obtendo IS acima de 22,5 (Rodríguez-Hernández et al. 2016b).

Devido ao caráter hidrofóbico do DHe, verificado a partir de sua estrutura química e por testes de diluição, optamos por fazer os experimentos utilizando formulações lipossomais o que, além de garantir uma boa entrega do composto, poderia conferir uma eficácia ainda maior à sua ação. Essa expectativa se devia ao fato dessa maior eficiência já ter sido observada em vários estudos que buscaram avaliar a eficácia de fármacos, já utilizados na terapêutica da leishmaniose, que são incorporados à lipossomas. Pesquisas de Frézard et al (2000), por exemplo, avaliaram o uso de Sb^v encapsulada em lipossomas no tratamento de *L. infantum* em hamsters infectados. Os resultados demonstraram uma significativa redução na carga parasitária no fígado dos animais tratados em comparação aos animais tratados com Sb^v livre na mesma concentração. Outro dado mais interessante foi

descrito por Sundar et al. (2010) que tratou pacientes com leishmaniose visceral utilizando anfotericina B lipossomal. Os autores verificaram que uma única dose da formulação lipossomal obteve resultados com eficiência equivalente à AmB livre administrada durante 29 dias. Santos et al (2018), também trabalhando com AmB, testaram uma nova formulação lipossomal, contendo esse fármaco, que apresentou melhores resultados na redução de carga parasitária de fígado e baço de animais em comparação a grupos que foram tratados com AmB convencional.

Nossa formulação foi preparada com os fosfolipídeos DSPC e DPPG, os valores de tamanho, IP e PZ foram avaliados para verificar a viabilidade de seu uso. Os valores de diâmetro da formulação contendo o fármaco (FL-DHe = 138nm) e sem o fármaco (FL-V= 104nm) foram aproximados, mostrando que o DHe não apresentou muita influência no tamanho da partícula. Além disso, como já citado, as formulações que apresentam diâmetros entre 100 nm e 200 nm têm a característica de possuir uma maior meia-vida na circulação sendo menos reconhecida pelo SMF em testes com modelo *in vivo* estando mais aptos promover interações eficientes com as células e tecidos alvo estando, assim, dentro de bons valores de lipossomas (Awasthi et al., 2003; Ishida et al., 1999; Litzinger et al., 1994; Park et al, 2002)

Os valores de IP de ambas as formulações (FL-V e FL-DHe) foram abaixo de 0,3 refletindo uma homogeneidade adequada da distribuição do tamanho das partículas das duas formulações, sendo considerada uma formulação monodispersas (Hunter & Frisken, 1998; Weiss-Angelie et al., 2008). Esse caráter foi muito importante uma vez que, para garantir um comportamento estável e consistente é desejável que o perfil de dispersão das partículas seja o mais monodisperso possível (mais próximo de 0), especialmente em sistemas de veiculação de fármacos. (Mehnert & Mäder, 2001).

O resultado de FL-DHe para as medidas de potencial zeta indicam que, ao ser incorporado, o composto DHe não alterou os valores negativos de carga superficial, mostrando, como já supracitado, que foi mantida no sistema uma repulsão eletrostática entre lipossomas, garantindo que não houvesse agregação com as outras partículas da formulação e houvesse melhor interação com as células (Balest, 2013; Bozzuto & Molinari, 2015) .A presença do fármaco levou á produção de lipossomas ligeiramente menos negativos (-19,5mV), em comparação

ao resultado de FL-V(-21mV), entretanto, o caráter de superfície aniônica se manteve.

Uma característica interessante já descrita e sugerida em estudos histológicos é a de que os lipossomas com cargas negativas tendem a se difundir na derme e folículos capilares mais rapidamente do que os de carga positiva (Ogiso et al, 2001; Gillet et al. 2011). Esses dados mostram que, a partir dessa característica físico-química, FL-DHe poderia ser considerada para seguir, também com testes em tratamentos dérmicos para lesões provenientes de leishmaniose cutânea e mucocutânea.

Os dados de diâmetro, IP e PZ permitiram observar que os resultados obtidos nesse estudo podem ser considerados de qualidade, quanto aos parâmetros físico-químicos analisados, estando a formulação apta a ser utilizada nos testes seguintes.

Como essa nova formulação se tratava de um produto final diferente do testado no trabalho de Rodriguez-Hernandez et al. (2016b), onde trabalhamos somente a molécula livre, optamos por repetir os testes de eficácia *in vitro*, sob as formas amastigotas de *L. infantum* infectando macrófagos. Esse modelo de infecção utilizando os macrófagos é um dos mais adequados, pois essas células desempenham um papel central na resposta imune do hospedeiro parasitado além de ser o principal alvo de infecção do parasito (Tomiotto-Pellissier, 2018). O diferencial do teste, também, é a capacidade de investigar a ação do composto sobre as formas intracelulares do protozoário simulando melhor a provável atividade a interação do parasito-hospedeiro, *in vivo*, em comparativo à testes que utilizam somente o parasito em cultura.

Como observado nos testes de atividade leishmanicida, FL-DHe exibiu, novamente, valores promissores de atividade ($IC_{50}=13\mu M$) inibindo a proliferação intracelular das amastigotas de *L. infantum* além de resultar, também, em valores reduzidos de citotoxicidade gerando valor de IS de 8.46. Já a AmB, controle positivo, apresentou atividade leishmanicida em uma concentração próxima de FL-DHe, mas, por outro lado, demonstrou um caráter tóxico sobre as células analisadas obtendo somente o valor de IS de 1.35, mantendo seu comportamento

tóxico, como previamente descrito. (Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas 2009; Kagan, 2012).

O IS demonstra o quanto a ação de um composto é direcionada ao parasito sem causar danos às células dos mamíferos, ou seja, quanto maiores os valores obtidos, mais seletiva será a ação da formulação sobre os parasitos sem danificar as células hospedeiras (Caldeira, 2011). Ao apresentar um IS igual a 1.35, podemos inferir que a dose tolerada até que a AmB seja tóxica para o organismo, é somente 1.35x maior do que a dose ativa ($17 \mu\text{M} \times 1.35 = \sim 23 \mu\text{M}$) enquanto que, para a formulação testada seria possível utilizar uma dose até 8.46x maior do que a dose ativa ($13 \mu\text{M} \times 8.46 = \sim 110 \mu\text{M}$), valor cerca de 5x superior ao da dose máxima da AmB. De acordo com Badisa et al., (2009) e Bezivin et al. (2003) é necessário um índice de seletividade 3 para potenciais candidatos a medicamentos, o que reafirma o potencial de FL-DHe na pesquisa de novos fármacos. Já Oryan et al., (2015) descrevem que um medicamento com ação leishmanicida será considerado seguro quando seu índice de seletividade for maior do que 10. Independente do padrão a ser seguido, o presente estudo e muitas de suas referências já citadas, evidenciaram que poucos compostos atingiram valores ≥ 10 nos testes, mostrando que esse índice pode ser variável. DHe em sua forma livre atingiu valores $\text{IS} = 22,5$ nos mesmos testes, mostrando que uma investigação mais detalhada dos mecanismos de ação e cinética do fármaco quando encapsulado e estabilidade da formulação, devem ser conduzidas.

Ao buscarmos novos fármacos, devemos pensar não somente na relação do composto com o parasito, mas também na sua interação com outras células e sistemas (Islamuddin et al., 2015; Bezerra 2020). Assim, após o estudo de atividade leishmanicida e seletividade em macrófagos, FL-DHe também foi testada quanto à citotoxicidade contra células hepáticas (HepG2) e renais (BGM) para tentar avaliar seus efeitos em diferentes partes dos organismos. Conforme observado na Tabela 4, o composto de referência no tratamento (AmB) apresentou CC_{50} à $13 \mu\text{M}$ e $9 \mu\text{M}$ para células do rim e do fígado, respectivamente. Estes resultados confirmam novamente que esse fármaco, utilizado em pacientes com leishmaniose, apresenta uma toxicidade considerável. Já FL-DHe apresentou um CC_{50} acima de $1000 \mu\text{M}$ para células de rim e de $92 \mu\text{M}$ para hepatócitos, mais uma vez afirmando que o seu baixo potencial citotóxico a coloca como uma potencial formulação.

Esse é um resultado promissor, levando em conta que uma das alterações comumente encontradas em pacientes acometidos por leishmaniose visceral são as alterações hepáticas e renais (Salgado et al. 2003; De Oliveira et al., 2010; Sena, 2015). Fármacos que prejudicam as funções desses órgãos ou causam maiores lesões (hepatotóxicos ou nefrotóxicos), como ocorre com o uso de Sb^v e AmB, por exemplo, não são boas opções para serem aplicados na terapêutica, pois poderiam gerar um agravamento do quadro da doença, suportando ainda mais a problemática de não existirem muitas alternativas eficientes para substituição desses fármacos como primeiras escolhas de tratamento da LV e reforçando a necessidade da investigação de novos compostos (Rath et al. 2003; Salgado et al. 2003; De Oliveira et al., 2010; Sena, 2015; Fiocruz, 2016; Ammar et. al., 2019).

Embora nossos testes tenham demonstrado a baixa toxicidade de FL-DHe em células desses órgãos (BGM, HEPG2), *in vitro*, a formulação, ao ser administrado no animal, poderia ter um comportamento diferente, pois o sistema de testes *in vivo* é um sistema muito mais complexo do que o processo *in vitro*. Desse modo, para avaliar se os compostos manteriam a baixa toxicidade, também, sobre esses órgãos no modelo animal, 34 camundongos saudáveis da linhagem Balb/c foram divididos em 6 grupos, os quais foram tratados separadamente com PBS, FL-V e 4 concentrações de FL-DHe.

De acordo com as características da formulação obtida esperava-se que, uma vez no organismo, a formulação tenderia a ter uma meia-vida maior por se considerar que o sistema de entrega seria mais gradativo. Assim, o esquema terapêutico poderia ser montado considerando-se o uso de em um menor número de doses com as aplicações mais intervaladas. Entretanto, afim de verificar com mais segurança se não ocorreria toxicidade, utilizamos uma maior quantidade de doses com aplicações menos intervaladas (15 dias de tratamento com aplicações de doses em dias alternados → 7 doses) e, caso não observássemos toxicidade, realizaríamos os testes de atividade leishmanicida com intervalos de tratamento mais espaçados. Após tratamento, análises histopatológicas e bioquímicas foram feitas para observar possíveis alterações hepáticas e renais nos grupos tratados.

Nos dados obtidos da avaliação do fígado, os grupos tratados com as doses de FL-DHe e FL-V não apresentaram características de lesão ou inflamação significativos, quando em comparação aos animais tratados somente com PBS, e

mantiveram-se próximos ao grau 1 de score de lesão, apresentando discretos infiltrados inflamatórios. O cenário se manteve quando avaliamos os resultados do rim onde, embora o grupo PBS tenha apresentado score 0 na avaliação, nenhum dos outros grupos apresentou diferenças estatísticas significativas em comparação a ele ($p > 0,05$). A ausência de lesões em ambos os órgãos pode ser observada nas fotomicrografias das figuras 14 e 15 onde, salvo escassas células inflamatórias próximas a ductos e vasos sanguíneos, é mostrado um aspecto do parênquima dentro da normalidade para fígado e rim dos animais de todos os grupos.

Nas análises bioquímicas, a função renal foi avaliada por meio da dosagem de níveis de ureia e creatinina e a função hepática foi avaliada por meio da dosagem de TGO e TGP.

Em todos os grupos, as concentrações de ureia apresentaram valores próximos aos valores de referência esperados para camundongos (Almeida et al., 2008, Matida et al., 2015; De Sousa Barbosa et al., 2017). Os níveis de creatinina, também, encontram-se inseridos dentro do padrão de normalidade em todos os animais testados. Ambos os resultados, juntamente às análises histopatológicas podem afirmar que não houve toxicidade renal decorrente dos testes com ambas as formulações.

Ao avaliar a função hepática, os valores de TGO para todos os animais tratados mantiveram-se dentro de padrões de referência esperados para as concentrações dessa enzima em camundongos e nenhuma diferença estatística foi identificada entre os grupos tratados e o grupo PBS (Matida et al., 2015; De Sousa Barbosa et al., 2017).

A partir dos valores obtidos de TGP, verificamos que um dos grupos tratados (0,03mg/kg) apresentou diferença estatística com o grupo PBS. Como nenhuma outra alteração foi evidenciada nos outros parâmetros ou nos cortes histológicos do mesmo grupo, não consideramos que esse valor seria decorrente de lesões ou alterações hepáticas que justificassem o resultado. Além disso, nenhuma das outras doses de FL-DHe ou a FL-V apresentaram diferenças significativas com o grupo PBS o que mostra que a redução, provavelmente, não está ligada às formulações

Nos testes de atividade leishmanicida no modelo murino, optamos por utilizar o fígado e o baço nas análises, no lugar do rim, uma vez que é amplamente descrito

na literatura que esses dois órgãos estão entre os locais de maior tropismo do parasito dentro do hospedeiro mamífero (Mathias et al., 2001; Evans & Kedzierski, 2011). Para realizar os tratamentos, dezoito animais infectados com *L. infantum* foram divididos em três grupos, cada um recebendo uma infusão diferente: um grupo não tratado - PBS (NT); um grupo tratado com FL-DHe (33mg/kg); um grupo tratado com FL-V.

Devido ao fato do lipossoma poder apresentar o comportamento de liberar o composto de forma gradativa devido ao diâmetro das vesículas formadas e sua potencial capacidade de ser direcionado aos órgãos de interesse (Fígado, Baço), como já citados anteriormente, foi realizada a administração das doses em intervalos maiores do que os utilizados nos testes anteriores, por um menor tempo de tratamento, como descrito na figura 10 (12 dias de tratamento com aplicação das doses a cada 96hrs → 3 doses) com a eutanásia realizada 96hrs após a última dose administrada.

Ao término do tratamento, realizamos a eutanásia, coletamos as amostras e foram realizadas as análises por PCR em tempo real e programa estatístico software GraphPadPrism 8. A partir dos resultados citados no subitem 5.5 observou-se que os valores da carga parasitária resultante após o tratamento dos animais infectados, utilizando as formulações FL-DHe e FL-V não foram, estatisticamente, diferentes dos apresentados pelo grupo que não recebeu tratamento com lipossomas (NT) ($p \geq 0,05$). Já nos valores obtidos com as amostras de baço dos animais tratados, novamente, não foi observado diferença entre o grupo NT e FL-DHe nem mesmo entre os grupos FL-V e FL-DHe ($p \geq 0,05$). Porém, ocorreu uma diferença significativa entre os valores do grupo NT e FL-V ($p = 0,02$).

Essa, aparente, baixa atividade leishmanicida dos compostos, demonstrada com esses resultados pode ter ocorrido devido a vários fatores.

Após a administração, os lipossomas ficam sujeitos: à ação de fluidos e componentes biológicos que podem alterar a permeabilidade de sua membrana; à ação de opsoninas que podem aderir à membrana do lipossoma e fazer com que este seja mais rapidamente capturado da circulação e levando à liberação do fármaco níveis abaixo do esperado no tecido alvo (Torchilin, 2005; Machado et al., 2007; Chrysostomo, 2011); ocorrência de interação com lipoproteínas na circulação que levariam à transferência de seus lipídeos para elas ou a passagem de algum

componente da lipoproteína para o lipossoma levando à formação de poros e liberação do conteúdo interior da vesícula antes que atinja o alvo ou até a um aumento no tamanho das vesículas, em decorrência do contato com essas lipoproteínas, comprometendo as propriedades dos lipídeos (Torchilin, 2005; Machado et al., 2007; Chrysostomo, 2011). Além disso, os fatores acima podem ter sido facilitados devido ao caráter negativo das partículas, pois já foi descrito que apesar de partículas carregadas serem mais estáveis, como citado anteriormente, os lipossomas com carga negativa tendem a interagir mais rapidamente com o sistema biológico e estarem sujeito a opsonização e ação das lipoproteínas. (Bozzuto & Molinari, 2015).

Um cenário parecido pôde ser observado em um trabalho de Silva, 2018, que avaliava a eficácia de um fármaco encapsulado, com os mesmos fosfolipídios, na terapêutica da leishmaniose. No estudo, a maior dose testada em um dos grupos gerou um aumento exacerbado da carga parasitária. Em testes para tentar justificar essa exacerbação, foi detectada um aumento da interleucina 6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, em comparação aos outros grupos de teste (Murray, 2008). Altos níveis dessa citocina podem inibir a produção de TNF- α que pode inibir as respostas do tipo TH1 e, conseqüentemente induzir respostas TH2 levando a uma diminuição da atividade do macrófago no controle parasitário, favorecendo o aumento da carga. Embora o trabalho não descreva se é a formulação ou o fármaco utilizado o responsável pelo comportamento não esperado, ele serve de referência para futuras análises que podem ser incluídas nos próximos testes para refinamento da formulação, visto que, a influência dos lipossomas no processo, é uma hipótese a ser considerada.

Vale ressaltar que, apesar da diferença entre o grupo FL-V e o grupo NT, nenhum dado obtido de análises histopatológicas ou bioquímicas relatados nesse trabalho evidenciaram toxicidade ou lesões que influenciariam ou potencializariam a ação fármaco encapsulado, ao contrário, os tecidos de todos os grupos encontravam-se com aspecto normal.

Uma redução significativa da carga pode, também, ter sido influenciada pelo protocolo de tratamento utilizado, visto que as doses e os intervalos de tratamento podem ter sido insuficientes. Outros testes serão conduzidos para verificar essa suposição.

Em conjunto, nossos dados demonstram que a formulação FL-DHe apresenta boa atividade parasiticida e baixa toxicidade *in vitro*. Que o comportamento das formulações no tratamento *in vivo*, demonstrada por dados inconclusivos, pode estar relacionada ao comportamento da formulação lipossomal no animal por consequência de alguma de suas características físico-químicas, e que o protocolo de intervalos de tratamento ou da concentração utilizada de FL-DHe podem ser revistos visando um melhor refinamento da formulação e esquema terapêutico. Para isso, análises de interação celular, biodisponibilidade, dosagem de citocinas, farmacocinética e farmacodinâmica das formulações, podem ser aplicados.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu para o desenvolvimento de um sistema de liberação e entrega de fármacos com uma estrutura adequada e bem desenvolvida sem efeitos tóxicos em modelo de testes celulares e animal, além de apresentar eficácia considerável em modelo *in vitro*. Embora a formulação não tenha apresentado resultados conclusivos no tratamento de animais infectados com *L. infantum* em modelo murino, os dados apresentados demonstram que ainda há espaço para novas análises e estudos para o refinamento de formulação com um grande potencial a ser explorado.

8. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0004349, Mar 2016.

ALBIERO, Adriana Lenita Meyer et al. Actividad citotóxica de los frutos de *Sapindus saponaria* L. sobre las células de tumor ascítico de Ehrlich. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 20, 2001.

ALBIERO, Adriana L. Meyer; SERTIÉ, Jayme Antonio Aboin; BACCHI, Elfriede Marianne. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. **Journal of ethnopharmacology**, v. 82, n. 1, p. 41-44, 2002.

Alencar JE. Expansão do Calazar no Brasil. **Ceará Méd.** 1983;5:86–102.

ALLAHVERDIYEV, Adil M. et al. A new approach for development of vaccine against visceral leishmaniasis: Lipophosphoglycan and polyacrylic acid conjugates. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 9, p. 877-886, 2017.

ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.

ALMEIDA, Aline Silva et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 6, p. 429-432, 2008.

ALVES, E.B, et al. Dificuldades operacionais no uso de coleiras caninas impregnadas com inseticida para o controle da leishmaniose visceral, Montes Claros, MG, 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e2017469, 2018.

AMMAR, Aiman Abu et al. Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. **Drug delivery and translational research**, v. 9, n. 1, p. 76-84, 2019.

ANTONIALLI, Suely Aparecida Correa et al. Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil. **Journal of infection**, v. 54, n. 5, p. 509-514, 2007.

AULNER, Nathalie et al. High content analysis of primary macrophages hosting proliferating *Leishmania* amastigotes: application to anti-leishmanial drug discovery. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2154, 2013.

AWASTHI, V. D. et al. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. **International journal of pharmaceuticals**, v. 253, n. 1-2, p. 121-132, 2003.

BADARO, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of infectious diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003-1011, 1986.

BADISA, Ramesh B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer research**, v. 29, n. 8, p. 2993-2996, 2009.

BALEST, Aïessa Pagliarini. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). 2013. **UNB**

BATISTA, Cinthia Meireles; CARVALHO, Cícero Moraes Barros de; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BEZERRA, Juliana Maria Trindade et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 9, 2018.

BEZERRA, Érika Alves et al. Garcinielliptone FC: Selective anti-amastigote and immunomodulatory effects on macrophages infected by *Leishmania amazonensis*. **Toxicology in Vitro**, v. 63, p. 104750, 2020.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 499-503, 2003.

BORGES, Bárbara Kellen Antunes et al. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 777-784, 2008.

BOZZUTO, Giuseppina; MOLINARI, Agnese. Liposomes as nanomedical devices. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 975, 2015.

BRUNT, Elizabeth M. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. **Hepatology**, v. 31, n. 1, p. 241-246, 2000.

CALDEIRA, Leila Rodrigues. Nanoemulsões carregadas com anfotericina B para o tratamento das leishmanioses: uma nova abordagem. 2011. **UFMG**

CARMO, Vildete Aparecida Sousa. Preparação, caracterização e marcação de lipossomas pH-sensíveis com tecnécio-99m para identificação de focos inflamatórios. 2007. **UFMG**

CARVALHO, G. M. L. et al. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. **Journal Medical Entomology**; v. 47, p. 972-976, 2010.

CHRYSOSTOMO, Taís Nader. Estudo *in vitro* do efeito da ativação do Sistema Complemento na estabilidade de lipossomas de diferentes composições: seleção do melhor sistema de liberação e sua avaliação como carreador de flavonoides. 2011. **Universidade de São Paulo**.

COSTA-SILVA, Thais A. da et al. Antileishmanial activity and immunomodulatory effect of secosubamolide, a butanolide isolated from *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019.

DATASUS 2020 – Leishmaniose visceral: Casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvmg.def>

DE CAMARGO-NEVES, Vera LF et al. Avaliação da eficácia Lambdacialotrina para o controle de *Lutzomyia longipalpis*. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 4, n. 43, p. 04-11, 2007.

DE OLIVEIRA, Janaina Michelle et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, 2010.

DE SOUSA BARBOSA, Brenna et al. Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1-5, 2017.

DE SOUZA, Ligia Elena. Mistura de lipossomas convencionais e furtivos: estudos farmacocinéticos em camundongos e otimização do processo de encapsulação do antimoniato de meglumina. 2013. **UFMG**

DOS SANTOS NOGUEIRA, Fabio et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019.

EVANS, Krystal J.; KEDZIERSKI, Lukasz. Development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, 2012.

FABRICANT, Daniel S.; FARNSWORTH, Norman R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. suppl 1, p. 69-75, 2001.

FILIPPIN, Fabíola Branco; SOUZA, Liliete Canes. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

Fiocruz (2014) – OMS alerta para doenças transmitidas por vetores e Ensp lista as mais comuns no Brasil. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/oms-alerta-para-doencas-transmitidas-por-vetores-e-ensp-lista-mais-comuns-no-brasil>. Data de acesso: 15/01/20

Fiocruz (2016) - Combinação de medicamentos é aposta para o tratamento das leishmanioses. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/combinacao-de-medicamentos-e-aposta-para-o-tratamento-das-leishmanioses>. Data de Acesso: 03/02/20

Fiocruz (2019a) - Leishmaniose é tema de encontro de pesquisadores. Disponível em: <https://www.fiocruzbrasil.fiocruz.br/leishmaniose-e-tema-de-encontro-de-pesquisadores/>

Fiocruz (2019b) Leishmanioses: conheça os insetos transmissores e saiba como se prevenir. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/leishmanioses-conheca-os-insetos-transmissores-e-saiba-como-se-prevenir>

FRÉZARD, F. et al. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 33, n. 7, p. 841-846, 2000.

GAONA, V. V. O. Desenvolvimento de um sistema de liberação sustentada de antimoniato de meglumina em lipossomas e avaliação de sua atividade em macrófagos DH82 infectados com "*Leishmania infantum*". 2016. **Universidade Estadual de Campinas**.

GAUTHIER, Charles et al. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane-and oleanane-type saponins. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2002-2008, 2009.

GILLET, Aline et al. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. **International journal of pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 223-231, 2011.

GHOSH, Subhalakshmi et al. Valeriana wallichii root extracts and fractions with activity against *Leishmania* spp. **Parasitology research**, v. 108, n. 4, p. 861-871, 2011.

GRILL, Fabio; ZURMENDI, Marcela. Leishmaniasis visceral en Uruguay. **Archivos de Pediatría del Uruguay**, v. 88, n. 1, p. 32-38, 2017.

HAAVIKKO, Raisa et al. Heterocycle-fused lupane triterpenoids inhibit *Leishmania donovani* amastigotes. **MedChemComm**, v. 5, n. 4, p. 445-451, 2014.

HANDMAN, Emanuela. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 229-243, 2001.

HANSEN, Jakob; BROSS, Peter. A cellular viability assay to monitor drug toxicity. **Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging: Concepts and Protocols**, p. 303-311, 2010.

HARHAY, Michael O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HUNTER, D. G.; FRISKEN, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. **Biophysical journal**, v. 74, n. 6, p. 2996-3002, 1998.

HUSSAIN, Hidayat et al. Fruitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011. **Chemical reviews**, v. 114, n. 20, p. 10369-10428, 2014.

INCEBOZ, Tonay. Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. In: Current Topics in Neglected Tropical Diseases. **IntechOpen**, 2019.

ISHIDA, Osamu et al. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. **International journal of pharmaceuticals**, v. 190, n. 1, p. 49-56, 1999.

ISLAMUDDIN, Mohammad et al. Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 1, 2015.

KAGAN, Sarah et al. Toxicity mechanisms of amphotericin B and its neutralization by conjugation with arabinogalactan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5603-5611, 2012.

KAMHAWI, Shaden. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KEDZIERSKI, Lukasz. Leishmaniasis vaccine: where are we today?. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 177, 2010.

Killick-Kendrick R 2010. Education is key to controlling visceral leishmaniasis. **Bull World Health Organ** 88: 11-12.

Kirby, C., Gregoriadis, G. Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes. **Nat Biotechnol**, 1984, 2, 979–984

LAINSON, Ralph; RANGEL, Elizabeth F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LANIADO-LABORÍN, Rafael; CABRALES-VARGAS, Maria Noemí. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

LEGRAND, P. et al. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. **STP Pharma sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LITZINGER, David C. et al. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly (ethylene glycol)-containing liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1190, n. 1, p. 99-107, 1994.

LOPES, Marcela S. et al. Synthesis and evaluation of the anti parasitic activity of aromatic nitro compounds. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 11, p. 5443-5447, 2011.

MACHADO, Livia Cristina; GNOATTO, Shildrey Anne; KLÜPPEL, Maria Lúcia W. Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura. **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 67, 2007.

MACIEL, Michelline V. et al. Atividade inseticida *in vitro* do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 07-11, 2010.

MAIA, C. et al. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. **Acta tropica**, v. 103, n. 2, p. 150-155, 2007.

MAJESTER-SAVORNIN, B. et al. Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity. **Planta medica**, v. 57, n. 03, p. 260-262, 1991.

MATHIAS, R.; COSTA, F. A. L.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 4, p. 539-543, 2001.

MATIDA, Elisangela Tieko et al. Determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos (*Mus musculus*) do biotério central da UFMS. RESBCAL: **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.**, v. 3, n. 1, p. 30-35, 2015.

MEHNERT, Wolfgang; MÄDER, Karsten. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MELO, Tahira Souza et al. Oleanolic acid (OA) as an antileishmanial agent: Biological evaluation and in silico mechanistic insights. **Parasitology international**, v. 65, n. 3, p. 227-237, 2016.

Ministério da Saúde (**MS**) – 2005. Guia de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf

Ministério da Saúde (**MS**) – 2006. Leishmaniose Visceral Grave – Normas e Condutas. Disponível em: https://www.saude.gov.br/images/imagens_migradas/upload/arquivos/2012-05/manual_lv_grave_nc_nopw_lta_humana.pdf

Ministério da Saúde (**MS**) – 2017. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Brasília/DF. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

Ministério da Saúde (**MS**) – 2019. Boletim Epidemiológico - Disponível em: <https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>

MISHRA, B. B. T. S.; PATEL, Bhavesh B.; TIWARI, Sanjay. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine**, v. 6, n. 1, p. 9-24, 2010.

MISHRA, Bhuwan B.; TIWARI, Vinod K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011.

MONGE-MAILLO, Begoña; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical infectious diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398-1404, 2015.

MONZOTE, Lianet et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 20-26, 2014.

MOTOIE, Gabriela et al. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 48-59, 2013.

MURRAY, Henry W. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. **Infection and immunity**, v. 76, n. 9, p. 4088-4091, 2008.

NUNES, Cárís Maroni et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 153, n. 1-2, p. 19-23, 2008.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia humana**. 13a Edição. pp.41-47, 69-90, 399-409. Atheneu, 2016.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NILUBOL, Naris et al. Four clinically utilized drugs were identified and validated for treatment of adrenocortical cancer using quantitative high-throughput screening. **Journal of translational medicine**, v. 10, n. 1, p. 198, 2012.

OGISO, Taro et al. Effect of positively and negatively charged liposomes on skin permeation of drugs. **Journal of drug targeting**, v. 9, n. 1, p. 49-59, 2001.

OLIVEIRA, Alessandra Gutierrez de et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 869-874, 2006.

OLIVEIRA, Agda Maria et al. Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 233-242, 2016.

OLIVEIRA, Agda M. et al. Dispersion of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil: identification of associated factors through survival analysis. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2018.

Organização Pan-Americana da Saúde (**OPAS**) Brasil 2018 – Infográfico Brasil. Leishmaniose Cutânea e mucosa.– Disponível em: http://www.panaftosa.org/leish/inf2018_pt/INFO_BRA_2018_PORT.pdf

Organização Pan-Americana da Saúde (**OPAS**) – Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas. 2019. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian journal of veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.

PARK, John W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 3, p. 95, 2002.

PELLISSARI, Daniele Maria et al. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PIMENTA, Paulo Filemon Paolucci; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, Nágila Francinete Costa. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Cap, v. 12, p. 1-45, 2012.

RAJENDRAN, Lawrence; UDAYAR, Vinod; GOODGER, Zoë V. Lipid-anchored drugs for delivery into subcellular compartments. **Trends in pharmacological sciences**, v. 33, n. 4, p. 215-222, 2012.

RATH, S. et al. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RIBEIRO, Antônia et al. Molluscicidal saponins from the pericarp of *Sapindus saponaria*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 33, n. 3, p. 177-180, 1995.

ROCHA, Marília Fonseca et al. Dogs with divergent serology for visceral leishmaniasis as sources of *Leishmania* infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies—an observational study in an endemic area in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 2, p. e0008079, 2020.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D. et al. Hederagenin as a triterpene template for the development of new antitumor compounds. **European journal of medicinal chemistry**, v. 105, p. 57-62, 2015.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D. et al. Novel hederagenin–triazolyl derivatives as potential anti-cancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 115, p. 257-267, 2016a.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D. et al. Highly potent anti-leishmanial derivatives of hederagenin, a triperpenoid from *Sapindus saponaria* L. **European journal of medicinal chemistry**, v. 124, p. 153-159, 2016b.

ROJO, David et al. A multiplatform metabolomic approach to the basis of antimonial action and resistance in *Leishmania infantum*. **PloS one**, v. 10, n. 7, 2015.

SAHA, Supradip et al. Structure–biological activity relationships in triterpenic saponins: the relative activity of protobassic acid and its derivatives against plant pathogenic fungi. **Pest management science**, v. 66, n. 8, p. 825-831, 2010.

SALGADO, Filho Natalino; FERREIRA, Telma Márcia A.; COSTA, Jackson M. Involvement of the renal function in patients with visceral leishmaniasis (kala-azar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, 2003.

SANTOS, Délia Chaves Moreira dos et al. A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. **Journal of drug targeting**, v. 26, n. 4, p. 357-364, 2018.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Liposomes: has the magic bullet hit the target?. **Quimica Nova**, v. 25, n. 6 B, p. 1181-1185, 2002.

SEN, Rupashree; CHATTERJEE, Mitali. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1056-1069, 2011.

SENA, Ingrid Virgínia de Oliveira et al. Fatores associados ao óbito por leishmaniose visceral em hospital público de referência no estado do Piauí. 2015. **Fiocruz-RJ**

SEVA, Anaiá P. et al. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0160058, 2016.

SILVA, Maiara Maria Romaneli. Estudo pré-clínico da sertralina nanolipossomal na leishmaniose visceral. 2018. **Secretaria de Estado de Saúde - SP**

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. 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, n. 3, p. 239-51, May 2004.

SINGH, Nisha et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 1, p. 18-45, 2014a.

SINGH, Om Prakash et al. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 10, p. 1424-1429, 2014b.

SOARES-BEZERRA, R J. et al. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (**SBMT**) - Tratamento de cães com LVC fica autorizado com o Milteforan®, 2016. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br/portal/tratamento-de-caes-com-lvc-fica-autorizado-com-o-milteforan/>

SOUZA, C. M. et al. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 99, p. 795-803, 2004.

SOUZA, Getúlio Dornelles; SANTOS, Edmilson dos; ANDRADE FILHO, José Dilermando. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1181-1182, 2009.

SUNDAR, Shyam; OLLIARO, Piero L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, n. 5, p. 733, 2007.

SUNDAR, Shyam et al. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 6, p. 504-512, 2010.

SUNDAR, Shyam et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012.

TAKAGI, Keijiro; PARK, EUNHEE; KATO, HITOSHI. Anti-inflammatory activities of hederagenin and crude saponin isolated from *Sapindus mukorossi* Gaertn. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 4, p. 1183-1188, 1980.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TIMON-DAVID, P. et al. Research of antifungal activity from several active principle extracts from climbing ivy: *Hedera helix* L. **Annales Pharmaceutiques Français**, v. 38, n. 6, p. 545-552, 1980.

TOMIOTTO-PELLISSIER, Fernanda et al. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2529, 2018.

TORCHILIN, Vladimir P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 145-160, 2005.

TSOKANA, C. N. et al. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis, Leishmaniasis - **Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. 2014

Jornal da USP (**USP, 2020**) – Leishmaniose visceral avança para regiões urbanas do Brasil – Especial Epidemias, 2020. Disponível em: <https://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-da-saude/ciencias-especial-epidemias-22-01-leishmaniose-visceral-avanca-para-regioes-urbanas-do-brasil/#:~:text=Doen%C3%A7a%20grave%20causada%20por%20um,sul%20e%20sudeste%20do%20Pa%C3%ADs>. Data de acesso: 01/02/2020

VAN SWAAY, Dirk; DEMELLO, Andrew. Microfluidic methods for forming liposomes. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 5, p. 752-767, 2013.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

Viveiro Ciprest - Plantas Nativas e Exóticas. **Sapindus saponaria** - Sabão de Soldado ou Saboneteira - Imagem disponível em: <http://ciprest.blogspot.com/2016/08/sabao-de-soldado-ou-saboneteira.html>

WEISS-ANGELI, V. et al. Nanocapsules of octylmethoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p.80-89, 2008

WERNECK, Guilherme L. geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2937-2940, 2008.

World Health Organization (**WHO**) 2009 - Simposio Internacional Avances en la terapéutica de la leishmaniasis visceral International .Madrid, 18 y 19 de junio, 2009. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/disease_management/Advances_visceraleishmaniasis_therapy.pdf?ua=1

World Health Organization (**WHO**) 2010 - Application for Inclusion of Miltefosine on WHO Model List of Essential Medicines, 2010. Disponível em: https://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/18/applications/Miltefosine_application.pdf?ua=1

World Health Organization (**WHO**) 2020 – Leishmaniasis – Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

9. ANEXOS

9.4. Produção científica

9.1.1. Highly potent anti-leishmanial derivatives of hederagenin, a triperpenoid from *Sapindus saponaria*

European Journal of Medicinal Chemistry 124 (2016) 153–159



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Research paper

Highly potent anti-leishmanial derivatives of hederagenin, a triperpenoid from *Sapindus saponaria* L.



Diego Rodríguez-Hernández^{a,b}, Luiz C.A. Barbosa^{a,b,*}, Antonio J. Demuner^b, Raquel M. de Almeida^c, Ricardo T. Fujiwara^{c,**}, Sebastião R. Ferreira^c

^a Department of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of Chemistry, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H Rolfs s/n, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brazil

^c Department of Parasitology, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

9.1.2. Registro de Patente: “DERIVADOS DA HEDERAGENINA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO”



23/08/2016 870160045553
11:56



00.000.2.2.16.0621589.7

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 019337 0