



UFAM



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E
SAÚDE - CSAS**

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS COM NANOPARTÍCULAS DE
ANTIMÔNIO PENTAVALENTE NO TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

FABIANE VELOSO SOARES

**MANAUS
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA-INPA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E
SAÚDE - CSAS**

FABIANE VELOSO SOARES

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS COM NANOPARTÍCULAS DE
ANTIMÔNIO PENTAVALENTE NO TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologias para Saúde.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco, Doutora

Coorientador: Andriy Grafov, Doutor

**MANAUS
2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S676e Soares, Fabiane Veloso
Estudos pré-clínicos com nanopartículas de antimônio pentavalente no tratamento da leishmaniose cutânea / Fabiane Veloso Soares . 2017
175 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco
Coorientador: Andriy Grafov
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmania amazonensis. 2. Antimoniais pentavalente. 3. Tratamento experimental. 4. Nanopartículas. I. Franco, Antonia Maria Ramos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FABIANE VELOSO SOARES

**TRATAMENTO PRÉ-CLÍNICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA COM
NANOPARTÍCULAS DE ANTIMÔNIO PENTAVALENTE**

Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida por FABIANE VELOSO SOARES e aprovada pela Banca Avaliadora em 11 de Julho de 2017.

Banca Examinadora:

Dra. Antonia Maria Ramos Franco
Orientadora

Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo
Membro da Banca

Dra. Thais Tibery Espir
Membro da Banca

Dra. Francimeire Gomes Pinheiro
Membro da Banca

Dr. João Vicente Braga de Souza
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

As pessoas indispensáveis à minha vida e aos companheiros de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

O agradecimento aqui prestado está repleto de uma carga profunda de gratidão, pois num trabalho como este, com uma dedicação por 4 anos da minha vida, o resultado apresentado não é só meu, mas sim de todas as pessoas que, de formas distintas, contribuíram para este momento.

Agradeço a Deus, **por me guiar, me proteger e me iluminar. Por me dar forças para prosseguir na caminhada diária.**

Aos meus pais Carlos e Neidimar, pela vida e pelo amor dado a mim. Obrigada pela maneira como me educaram e por me incentivarem a seguir em frente (sempre nos estudos) e fazendo com que me sentisse capaz.

A Dilmar Martins pela ajuda constante ao longo desses anos.

Aos meus irmãos Maria, Maurício, Carlos Jr. e Carlos Eduardo, pelas alegrias compartilhadas, apoio incondicional e carinho constante.

Ao Sr. Ney Corrêa, pelos ensinamentos, incentivo e por estar sempre disposto a me ajudar.

A minha orientadora Dra Antonia Maria Ramos Franco, pelo acolhimento, atenção, carinho, amizade, paciência diante do meu transtorno de ansiedade (afinal foram muitas lágrimas), na tarefa de injeção de ânimo, pelas oportunidades nacionais e internacionais e pelo aprendizado em cada momento de orientação.

A Profa Maricleide Naiff, que me acompanha desde a graduação, contribuindo para minha formação profissional e pessoal, pelo apoio, carinho e incentivo.

Aos meus podréticos do coração: Ana Flávia Chagas, Bruno Jensen, Claudia Dantas, Pedro Rael e Vitor Nascimento, pelo auxílio incondicional e pela parceria nos bons momentos e nos dias de perrengue, momentos únicos na “salinha” do laboratório e fora dele também, todos regados por sorrisos. Os momentos que dividimos com certeza nos tornaram pessoas melhores! Essa vitória é nossa!

Ao amigo Pedro Rael C. Domingos (Pedroca), pela calorosa companhia nas terras geladas da Finlândia e pelo auxílio e paciência nas análises químicas.

A Dra Claudia Dantas, pela amizade, conversas, dicas e ensinamento químico (caracterização de biomoléculas) durante seu puerpério, nunca esquecerei. Tudo esta guardado no meu coração.

A Meire, pelo companheirismo, paciência, apoio e dedicação nos ensaios experimentais no Biotério Central.

A Luanda Figueira e Alana Vinhote, minhas amigas da alma, que mesmo morando longe nunca deixaram de me incentivar, vocês foram essenciais nas diferentes etapas desse ciclo de pós-graduação. Eu poderia escrever um texto de agradecimento à vocês e ainda assim não conseguiria traduzir o quão importante é a presença de vocês na minha vida, muito obrigada de coração!

A Camila Santos e Larissa Dolzane, jovens estudantes que me acompanham na pesquisa e na vida, direta ou indiretamente, fazendo parte dessa trajetória.

As alunas do Laboratório **Thais Mota, Any Brasil e Loiana Pinheiro**, pelo apoio.

Ao MSc. Leonardo Brandão Matos pelo apoio contínuo na área de Experimentação Animal no Biotério Central do INPA.

Ao Dr. José Fernando Marques, pelo auxílio e ensinamento com a Histologia e infraestrutura cedida (tenho até a cópia da chave do laboratório dele) e por todo tempo dedicado a minha tese. Os momentos no seu laboratório foram essenciais e divertidos. Sem esquecer a sua equipe, Rose, Maíssa, Lene e Mayla, que contribuíram neste trabalho.

Ao grupo do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, em especial à Ana Cleide, Lourival Maciel e Francimeire Gomes pelo suporte e colaboração durante todo o período de doutoramento.

A UFAM/PPGBiotec e ao INPA/Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, pela chance e ferramentas que permitiram chegar ao final desse ciclo de maneira satisfatória.

À CAPES, pela concessão das bolsas de pesquisa.

Por tudo isso, meu reconhecido MUITO OBRIGADA!

EPÍGRAFE

Ser enfermeira é ir além daquilo que os outros pensam que devemos fazer ou do que esta visível, transcende a simples definição da palavra e avança por terrenos nunca experimentados.

Autor desconhecido

RESUMO

A leishmaniose tegumentar é uma doença negligenciada, endêmica em áreas tropicais e subtropicais e o Brasil é um dos países mais acometidos pela doença. O tratamento com antimoniais pentavalente é utilizado há mais de 70 anos como medicamento de primeira escolha no país e tem se mostrado ineficaz contra algumas espécies de *Leishmania*. Além de tóxico, este se apresenta na forma injetável, oferece um amplo espectro de efeitos adversos e representa ainda alto custo de aquisição para o país. Conseqüentemente, existe uma necessidade imediata de pesquisas para novos compostos antileishmania, a fim de combater a resistência aos medicamentos utilizados, e que demonstre eficácia e segurança, visando de facilitar o tratamento da doença. Nanopartículas (NPs) prometem uma abordagem alternativa para novas drogas no tratamento de doenças infecciosas, pois sua pequena dimensão e grande área de superfície proporcionam uma oportunidade para que elas interajam com componentes vitais de agentes infecciosos, apresentando-se mais eficazes que as terapias tradicionais. Neste estudo NPs de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) em fase aquosa foram produzidas e caracterizadas, com o objetivo de avaliar seu efeito *in vitro* e *in vivo* no tratamento da leishmaniose cutânea. A concentração do Sb⁵⁺ foi determinada por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite; as NPs foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering – DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), submetidas a bioensaios *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, pelo método da contagem direta em câmara de Neubauer e quanto à atividade citotóxica em macrófagos de linhagem J774. No ensaio *in vivo*, os hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente inoculados com *L. amazonensis* foram agrupados para receber tratamento intralesional (focinho), com posterior eutanásia para retirada de fragmentos de tecidos para análise por impressão por aposição, cultivo de biópsia de lesões, histopatologia e MET. Os resultados obtidos neste estudo mostraram NPs com tamanho médio de 42 nanômetros e potencial zeta em torno de -49,8 mV, formato esférico, superfície lisa e dispersas nas suspensões. Os bioensaios indicaram que essas NPs apresentaram citotoxicidade nas concentrações mais altas testadas. A suspensão mais promissora foi a ETSbL2 que apresentou maior atividade antileishmania, com CE₅₀ de 1.05 mg/mL em 72h. Não foi notada a permanência de infecção nos macrófagos experimentalmente infectados quando tratados com NPs Sb⁵⁺. Após 26 dias de tratamento experimental, os animais apresentaram diferenças estatísticas significantes entre o grupo controle e os grupos tratados com NPs, quanto à área e aspecto clínico da lesão, e quanto ao controle parasitário. Os achados histológicos das lesões dos grupos tratados com essas NPs Sb⁵⁺ mostraram infiltrado inflamatório intenso, comprometendo tanto a camada dermosuperficial como a dermoprodonda do tecido. Alterações histológicas também foram observadas no fígado, baço e rim. Contudo, ETSbL1[b] (18,6mg/Sb⁵⁺/kg/dia) apresentou maior eficiência quanto a cura clínica referente a redução no tamanho da lesão e na carga parasitária entre as NPs testadas. Estes resultados sugerem a continuidade deste estudo com novos testes em animais menos suscetíveis a infecção (camundongos) objetivando uma possível cura clínica e parasitológica, bem como a avaliação dos parâmetros toxicológicos e bioquímicos após o tratamento.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*. Antimoniais pentavalente. Tratamento experimental. Nanopartículas.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is a neglected disease, endemic in tropical and subtropical areas, and Brazil is one of the countries most affected by the disease. Treatment with pentavalent antimonials has been used for over 70 years as the first choice drug in the country and has been shown to be ineffective against some *Leishmania* species. In addition to toxic, it presents in injectable form, offers a wide spectrum of adverse effects and still represents a high acquisition cost for the country. Consequently, there is an immediate need for research into new antileishmania compounds in order to combat resistance to the drugs used and to demonstrate efficacy and safety in order to facilitate the treatment of the disease. Nanoparticles (NPs) promise an alternative approach to new drugs in the treatment of infectious diseases because their small size and large surface area provide an opportunity for them to interact with vital components of infectious agents, and are more effective than traditional therapies. In this study, pentavalent antimony NPs (Sb^{+5} NPs) were produced and characterized in order to evaluate their effect *in vitro* and *in vivo* in the treatment of cutaneous leishmaniasis. The concentration of Sb^{+5} was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry; The NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM), submitted to *in vitro* bioassays against promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis*, by the direct counting method in the Neubauer chamber and To cytotoxic activity in J774 lineage macrophages. In the *in vivo* assay, the hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally inoculated with *L. amazonensis* were grouped to receive intralesional (snout) treatment, with subsequent euthanasia for removal of tissue fragments for analysis by impression by apposition, culture of lesion biopsy, histopathology And MET. The results obtained in this study showed NPs with mean size of 42 nanometers and zeta potential around -49.8 mV, spherical shape, smooth surface and dispersed in suspensions. Bioassays indicated that these NPs showed cytotoxicity at the highest concentrations tested. The most promising suspension was ETSbL2, which had the highest antileishmania activity, with EC_{50} of 1.05 mg/mL in 72h. The persistence of infection in experimentally infected macrophages when treated with Sb^{5+} NPs was not noted. After 26 days of experimental treatment, the animals had statistically significant differences between the control group and the groups treated with NPs, regarding the area and clinical aspect of the lesion, and regarding the parasitic control. The histological findings of the lesions of the groups treated with these Sb^{+5} NPs showed intense inflammatory infiltrate, compromising both the dermosuperficial layer and the dermoprofund of the tissue. Histological changes were also observed in the liver, spleen and kidney. However, ETSbL1[b] (18.6 mg/ Sb^{5+} /kg/day) showed greater efficiency in clinical cure regarding reduction in lesion size and parasitic load among the NPs tested. These results suggest the continuity of this study with new tests in animals less susceptible to infection (mice) aiming at a possible clinical and parasitological cure, as well as the evaluation of toxicological and biochemical parameters after treatment.

Keywords: *Leishmania amazonensis*. Pentavalent antimony. Experimental treatment. Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Formas promastigota (a) e amastigota intracelular (b) de <i>Leishmania</i>	25
Figura 02- Ciclo de Transmissão da Leishmaniose.....	26
Figura 03- Polimorfismo das lesões de Leishmaniose Cutânea.....	30
Figura 04- Distribuição Mundial da Leishmaniose Cutânea.....	32
Figura 05- Estrutura química dos antimoniais pentavalente.....	38
Figura 06- Modelos propostos por Demicheli e Frézard (2005) para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalente.....	41
Figura 07- Estrutura química da Isetionato de Pentamidina.....	43
Figura 08- Estrutura química da Anfotericina B.....	44
Figura 09- Escala de dimensões nanométrica.....	49
Figura 10- Nanopartículas: (a) NPs inorgânicas; (b) NPs poliméricas; (c) NPs lipídicas sólidas; (d) lipossomas; (e) nanocristais ou pontos quânticos; (f) nanotubos de carbono e (g) dendrímeros.....	52
Figura 11- Fluxograma com as etapas metodológicas do estudo.....	57
Figura 12 - Distribuição do potencial zeta (ζ) da suspensão ETSbL1[a] medido por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	76
Figura 13 - Distribuição do tamanho médio das partículas da suspensão ETSbL1[a], medido por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) [a] e fotomicrografia por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) [b].....	77
Figura 14 - Fotomicrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas de antimônio pentavalente.....	78
Figura 15 - Curva de crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	91
Figura 16 - Atividade das nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb5+) frente à formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	94
Figura 17 - Morfologia dos macrófagos infectados com formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	97
Figura 18 - Cronograma esquemático da experimentação animal.....	110
Figura 19 - Fluxograma do delineamento experimental utilizado neste estudo.....	112
Figura 20- Nódulo dérmico (histiocitoma leishmaniótico) [seta] no focinho do animal, 30 dias após inoculação com formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	116
Figura 21- Evolução clínica das lesões em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e tratados por 26 dias.....	117
Figura 22- Evolução clínica da área das lesões cutâneas em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> durante o tratamento.....	119
Figura 23- Avaliação ponderal dos hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	124

Figura 24 - Percentual médio do número de amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e macrófagos infectados após impressão em lâmina de fragmentos de lesão cutânea.....	125
Figura 25 - Scores de parasitas viáveis visualizados em cultura Novy-McNeal-Nicolle (NNN) após sete dias de incubação a 25° C provenientes de fragmentos de lesões cutâneas de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> dos grupos experimentais..	126
Figura 26 - Imagens ultraestruturais de macrófagos infectados com amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e tratados com nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb ⁵⁺)..	128
Figura 27 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pele, fígado, baço e rim de hamsters sem inoculação por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ..	132
Figura 28 - Fotomicrografia de cortes histológicos de lesão cutânea de hamsters infectados experimentalmente com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , corados com HE..	134
Figura 29 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados experimentalmente com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	137
Figura 30 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de hamsters infectados experimentalmente com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	140
Figura 31 - Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de hamsters infectados experimentalmente com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Taxa de incidência de LTA entre os anos de 2006 a 2012, nas regiões do Brasil.....	33
Tabela 2- Drogas mundialmente utilizadas para o tratamento atual da Leishmaniose Tegumentar Americana, isoladas ou coadministradas.	35
Tabela 3 - Programa de aquecimento para determinação de Sb em suspensões de NPs Sb ⁵⁺ por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) usando Pd ²⁺ e Mg ²⁺ como modificador.	74
Tabela 4 - Suspensões com nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb ⁵⁺) e os respectivos ligantes orgânicos selecionadas.	75
Tabela 5 - Concentração de antimônio pentavalente (NPs Sb ⁵⁺) presente em cada suspensão determinada por GF AAS.	79
Tabela 6 - Valores de CE ₅₀ (mg ± Desvio Padrão/DP), calculados por regressão linear (modelo Deming) das suspensões de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb ⁵⁺) após 24, 48 e 72 horas de incubação com promastigota de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	92
Tabela 7 - Efeito citotóxico das nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb ⁵⁺) em macrófagos de linhagem J774 incubados a 37° C por 72 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica (MTT).	96
Tabela 8 - Grupos experimentais, concentrações de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb ⁵⁺) e da droga comercial (Glucantime [®]) testadas e a vias de administração utilizadas.....	111

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Opções de tratamento para a forma cutânea localizada de leishmaniose tegumentar causada pela *Leishmania braziliensis* e por outras espécies de *Leishmania*, exceto *Leishmania guyanensis*.....36

Quadro 2 - Opções de tratamento para a forma cutânea localizada de leishmaniose tegumentar causada pela *Leishmania guyanensis*.37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM- Antimoniato de Meglumina
CDC - Center for Disease Control
DNDi - Drugs for Neglected Diseases initiative
DLS - Dinamic Light Scattering
DP- Desvio Padrão
ETAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
EV - Endovenoso
FDA- Food and Drug Administration
GLU- Glucantime®
IL - intralesional
IM – Intramuscular
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IT- Índice Terapêutico
IV – Intravenoso
LC - Leishmaniose Cutânea
LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa
LCD - Leishmaniose Cutânea Disseminada
LCL- Leishmaniose Cutânea Localizada
LMC - Leishmaniose Mucocutânea
LT - Leishmaniose Tegumentar
LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana
Lu - *Lutzomyia*
LV – Leishmaniose Visceral
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MS – Ministério da Saúde
MTT – Sal de tetrazólio
nm – Nanômetro
NMGA - N-metilglucamina
NNN - Meio de cultura sólido Novy, McNeal e Nicolle
NO - Óxido Nítrico
NPs - Nanopartículas
OMS - Organização Mundial de Saúde
RPMI 1640- Meio Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
Sb - Antimônio
Sb³⁺- Antimônio Trivalente
Sb⁵⁺- Antimônio Pentavalente
SBF- Soro Fetal Bovino
SFM- Sistema Fagocítico Mononuclear
SINAN- Sistema de Informação de Agravos e Notificações
WHO- World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa

β - beta

$^{\circ}$ - graus

$^{\circ}$ C - graus Celsius

®- marca registrada

% - por cento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. Considerações Gerais sobre Leishmaniose	23
2.1.1. Histórico da Doença	23
2.1.2. O Parasita	25
2.1.3. Determinantes da infecção: Interação <i>Leishmania</i> - macrófago	27
2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	29
2.3 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana	32
2.4 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana	34
2.4.1 Antimoniais Pentavalentes	37
2.4.1.1 Mecanismo de Ação dos Antimoniais	39
2.4.1.2 Resistência ao tratamento com Antimoniais Pentavalente	41
2.4.2 Isetionato de Pentamidina	42
2.4.3 Anfotericina B.....	43
2.4.4 Anfotericina B lipossomal.....	44
2.5 Drogas Alternativas no Tratamento da Leishmaniose	45
2.6 Aspectos relativos à Nanotecnologia	48
2.6.1 Nanomateriais.....	50
2.6.1.1 Nanopartículas (NPs).....	52
3. OBJETIVOS.....	55
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	56
CAPÍTULO I	58
CAPÍTULO II	69
CAPÍTULO III	83
CAPÍTULO IV.....	105
5. DISCUSSÃO GERAL.....	153
6. CONCLUSÕES FINAIS	156
7. PERSPECTIVAS	158
REFERÊNCIAS.....	159

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica e não contagiosa, ocasionando desde uma lesão cutânea (Leishmaniose Tegumentar/LT) a uma infecção visceral progressiva (Leishmaniose Visceral/LV), resultantes da infecção por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (TUON et al., 2008; PACE, 2014). Esses parasitas possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando entre hospedeiros mamíferos e invertebrados, sendo transmitidos durante o repasto sanguíneo pelo vetor, dípteros da família Psychodidae (BATES, 2007; BRASIL, 2017).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta manifestação polimórfica de pele e mucosas, estando associada à alta morbidade, constituindo um grande problema de saúde pública mundial, estando presente em 98 países e em quatro continentes, sendo incluída no *Program of Tropical Diseases Research* e classificadas como uma das seis doenças endêmicas cujo controle é prioritário (HOTEZ et al., 2007; MOURA et al., 2008; ALVAR et al., 2012), com registro anual de dois milhões de novos casos e mais de 15 milhões de pessoas infectadas no mundo, em uma área de risco que engloba mais de 350 milhões de pessoas (OMS, 2012).

Nas Américas, a LTA está presente em 18 países. No ano de 2013 foram registrados 47.492 casos de leishmanioses cutânea e mucosa, distribuídos em 16 países da região, com exceção da Venezuela e Guyana Francesa que não registraram dados no Sistema de Informação Regional de Leishmanioses (SisLeish). Do total de casos, 78,8% (37.402) estão concentrados no Brasil e nos países da sub-região Andina (OPAS, 2015).

No Brasil, no início da década de 80 foram registrados casos de LTA em 19 unidades federadas e em 2003 todos os estados registraram autoctonia. Estima-se que entre 1990 e 2015 ocorreram 674.694 casos, onde as maiores taxas têm sido registradas na Região Norte e Nordeste do país (SINAN/SVS/MS, 2017), causados por diversas espécies como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (GENARO; REIS, 2005; GUIZANI et al., 2011; GUIMARÃES, 2011).

No estado do Amazonas predomina a forma cutânea, principalmente na região metropolitana de Manaus, havendo raros casos de acometimento mucoso (OURIVES-

NEVES et al., 2011) e nenhum registro de casos autóctones de LV. Um total de 481 novos casos de LTA foi notificado no ano de 2013 e a transmissão ocorreu principalmente nos municípios de Rio Preto da Eva (136 casos), Presidente Figueiredo (107 casos), Itacoatiara (52 casos) e Manacapuru (25 casos) [SINAN/SVS/MS, 2014].

Durante décadas os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) permaneceram como primeira escolha terapêutica para o tratamento das leishmanioses (LIMA et al., 2007). Atualmente no Brasil, a indicação da droga deve considerar a espécie da *Leishmania* infectante, e o Ministério da Saúde recomenda como tratamento de pacientes infectados por *Leishmania braziliensis* e outras espécies, exceto *Leishmania guyanensis*, o Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®]) endovenoso ou intramuscular, por um período de 20 dias seguidos. Nos casos de pacientes oriundos de áreas onde há predomínio de *Leishmania guyanensis* a primeira escolha para o tratamento é o Isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) endovenoso ou intramuscular, de três a dez doses (BRASIL, 2017), mas o sucesso do tratamento depende de muitos aspectos, como resposta imune do hospedeiro, respostas clínicas e a susceptibilidade ao agente da leishmaniose (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010), pois há diversas espécies e formas clínicas.

Apesar da sua eficácia os medicamentos existentes para o tratamento dessa endemia estão relacionados a uma série de efeitos adversos, além do uso parenteral, o tempo de cura prolongado e o custo elevado do tratamento (PENNA et al., 2011). É importante destacar que a maioria dos casos da doença ocorre em áreas de difícil acesso, como em zonas rurais, o que dificulta a aplicação parenteral da droga e o monitoramento de seus efeitos colaterais, demandando um acompanhamento rigoroso em alguns casos (BASANO; CAMARGO, 2004).

O tratamento feito com as drogas de primeira escolha disponibilizadas pelo Ministério da Saúde, muitas vezes é entregue aos pacientes em ambiente rural que levam para suas casas devido à dificuldade quanto ao seu deslocamento diário, este fato assim como outras dificuldades no tratamento diário com estas drogas disponíveis representa um obstáculo à condução clínica adequada dos casos da doença, levando à redução, interrupção ou abandono da quimioterapia pelo paciente antes do seu término (DEMICHELI; FRÉZARD, 2005).

O progressivo aumento de resistência às drogas preconizadas representa outro sério problema no tratamento das leishmanioses (RATH et al., 2003). Em face dessas limitações, a Organização Mundial da Saúde recomenda o incentivo à busca de novos medicamentos, tratamentos com drogas alternativas, reposicionamento de fármacos, poliquimioterapia ou tratamentos combinados. Isso já ocorre para o tratamento de LV, por exemplo, houve a recomendação para o uso combinado de Estibogluconato de Sódio e Sulfato de Paromomicina como primeira linha de tratamento da doença na África Oriental. Também há terapias combinadas no subcontinente indiano, usando Anfotericina B lipossomal + Miltefosine, Paromomicina + Miltefosine, e Anfotericina B lipossomal + Paromomicina, o que sugere que as terapias multidrogas são seguras e eficazes (WHO, 2010; SUNDAR; CHAKRAVATY, 2015). Daí o interesse em se manipular drogas antigas de forma que a apresentação seja distinta e que a mesma possa ser até mesmo associada numa forma tópica ou menos invasiva, em menor dose e tempo.

Atualmente na Colômbia está sendo desenvolvido o Anfoleish, um creme contendo Anfotericina B a 3% que foi desenvolvido pelo Programa de Estudo e Controle de Doenças Tropicais (PECET) da Universidade de Antioquia, Medellín, Colômbia e a Humax Pharmaceutical, Medellín, Colômbia, como uma alternativa terapêutica tópica para o tratamento da LC não complicada (por exemplo, pacientes que respondem a esquemas terapêuticos recomendados, que não apresentam reação adversa, outros). Este é um estudo clínico de Fase clínica Ib/II, randomizado, não comparativo, e tem demonstrado segurança e eficácia nos regimes terapêuticos propostos (DNDI, 2016).

Diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para obtenção de novas formulações farmacêuticas sejam estas com produtos naturais, sintéticos ou semissintéticos, visando à liberação controlada de fármacos capazes de manter ou ampliar a ação de agentes promissores utilizados no combate e controle de doenças (JAIN et al., 2011). Essencialmente duas estratégias diferentes são disponíveis para o desenvolvimento de novos medicamentos. Uma estratégia envolve o planejamento/síntese de novas substâncias ativas ou de fármacos já conhecidos com modificações químicas; a outra envolve a associação reversível de fármacos já em uso a um sistema transportador, visando direcionar o fármaco para a célula alvo e

evitar os locais indesejáveis onde o fármaco exerce toxicidade (FRÉZARD; SCHETTINI, 2005).

Nesse contexto, técnicas inovadoras vêm demonstrando o grande potencial da nanotecnologia farmacêutica no tratamento, prevenção e diagnóstico de inúmeras patologias, dentre elas as parasitárias (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005; DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007; CARVALHO, 2011). Uma dessas técnicas é o desenvolvimento de nanopartículas, que têm obtido sucesso para a entrega sítio-específico de antibióticos, anticancerígenos, anti-hipertensivos, imunossupressores ou mesmo como coadjuvante de vacinas (PIMENTEL et al., 2007). Essa técnica também tem sido aplicada em tratamentos experimentais para leishmanioses, mostrando grande potencial terapêutico (ROSSI-BERGMANN et al., 2012; JEBALI; KAZEMI, 2013; CHAKRABORTY et al., 2014; JEBALI et al., 2014).

Acredita-se que os fármacos nanoestruturados sejam mais eficazes que as terapias tradicionais por eliminar diretamente microrganismos patogênicos sem desencadear a liberação de mediadores químicos (SURI; FENNIRI; SINGH, 2007), o fármaco preserva sua atividade farmacológica, pois a parte ativa da molécula não é alterada quimicamente e permite a diminuição da toxicidade e resistência relatadas com as drogas consideradas padrão (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007; PIMENTEL et al., 2007; KUMAR, 2012).

Os carreadores coloidais bem como lipossomos e nanopartículas são largamente estudados no sistema de entrega de drogas em células cancerígenas. Um bom exemplo é a Doxil (Doxorubicina lipossomal) que foi o primeiro agente quimiolipossomal aprovado pelo FDA no tratamento de diversos tipos de tumores como melanoma, câncer de cólon e de mama (NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003).

Outro setor que utiliza nanomateriais é o mercado de cosmético, assim como o de estética que está em constante desenvolvimento na busca por produtos com tecnologia mais desenvolvida, empregando nos mais diversos produtos, como: partículas metálicas para aumentar o brilho em maquiagens, nanoemulsões para cabelos, NPs de dióxido de zinco em protetores solar (DURAN; MARCATO; TEIXEIRA, 2010).

Vale ressaltar que a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada com base nos limitados recursos investidos no diagnóstico, tratamento e controle

(OMS, 2007). De 1400 medicamentos lançados no mercado internacional, apenas 13 são destinados ao tratamento de doenças chamadas tropicais e isto ocorre por acometer populações com baixo nível socioeconômico, reduzida força política e ainda por ser uma doença invisível para a indústria farmacêutica (PENNA et al., 2011; SUNDAR; CHAKRAVATY, 2015; SINGH et al., 2016).

Portanto, o tratamento da leishmaniose cutânea ainda é considerado um desafio terapêutico, criando a necessidade de terapias mais efetivas, eficazes, seguras e relativamente não invasivas, assim, é de fundamental importância ampliar os esforços com ênfase no estabelecimento de testes com novas drogas, seja sintéticas, semissintéticas e naturais, ou com drogas já conhecidas, mas com inovação tecnológica, para o tratamento da doença.

Desta forma, a realização deste estudo onde o princípio ativo de um semi-metal sintético com ação antileishmania, com segurança e eficácia comprovada, aprovado no mercado e disponível na terapêutica clínica, foi desenvolvido sob uma nova abordagem tecnológica, pode ser considerado uma possibilidade viável para o tratamento dessa doença negligenciada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações Gerais sobre Leishmaniose

2.1.1. Histórico da Doença

A Leishmaniose é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o século I d.C. (LAINSON, 1997; CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentam mutilações de lábios e nariz, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutânea-mucosa (LAINSON; SHAW, 1988). Posteriormente, através dos estudos da paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose (SANTOS; COIMBRA, 1994; NEVES, 2004).

A primeira referência de Leishmaniose Cutânea (LC) no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antiguidad de la Sifilis en el Peru”, onde ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas e Quiros, de Tabatinga/Amazonas até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico e o primeiro a observar o parasita do gênero *Leishmania* foi Cunningham (1885), na Índia, em casos de leishmaniose visceral (LV) [BASANO; CAMARGO, 2004].

No Brasil, Cerqueira (1855) observara a existência da moléstia da pele, identificando-a clinicamente como botão de Biskra. Mais tarde, em 1884, na Itália, o dermatologista Achille Breda descreveu a moléstia em 18 italianos provenientes de São Paulo, mas não reconheceu a natureza do parasita. A natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foram confirmadas no Brasil pela primeira vez em 1909 por Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania* idênticas à espécie *Leishmania tropica* da leishmaniose do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo (PESSOA apud BASANO; CAMARGO, 2004).

O dermatologista Edouard Jeanselme, em 1910, considerou que Breda foi o primeiro que cuidadosamente descreveu os aspectos clínicos da leishmaniose mucocutânea americana, chegando alguns pesquisadores a propor o nome de “doença de Breda” (PAMPLIGLIONE apud FURUSAWA; BORGES, 2014).

Em 1911 o sanitarista Gaspar Vianna, por considerar o parasita diferente da *Leishmania (Leishmania) tropica*, o batizou de *L. (Viannia) braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcer de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (SILVEIRA et al., 1997). Gaspar Vianna também foi o primeiro a descrever, em 1912, o sucesso do uso de “tártaro emético”, de antimônio trivalente no tratamento da leishmaniose (GOLDMAN apud FRAGA, 2007).

Em 1915 foram observados casos de LTA provenientes de todos os estados brasileiros, com exceção dos estados ao sul de São Paulo (d’UTRA e SILVA apud FURUSAWA; BORGES, 2014). O médico Alfredo da Matta propôs em 1918 uma nova classificação taxonômica das espécies de *Leishmania*, que contou com a *L. braziliensis* (DA MATTA apud VALE; FURTADO, 2005).

Até 1919, cerca de 15 mil pessoas adoeceram de LTA em São Paulo e, finalmente, em 1920, Cerqueira relata evidências da transmissão por flebótomos. Rabello em 1925 publicou o estudo Contribuições ao Estudo da Leishmaniose Tegumentar no Brasil, e considerou a ocorrência desta doença nas regiões Centro e Sul do país antes da metade do século XIX (NEVES, 2004).

Nos anos de 1939/1940, Samuel Pessoa descreve a LTA como “doença profissional da margem de mata” e, em 1941, estima em mais de 30 mil o número de doentes somente nas zonas rurais da região considerada de alta endemicidade. Em 1954, o médico sanitarista Thomaz Aragão afirma que a LTA afeta o cão e a raposa, reservatórios da doença (MAGALHÃES apud FURUSAWA; BORGES, 2014).

Em 1961 Pessoa já propunha a subdivisão da *L. braziliensis* nas variedades *braziliensis*, *guyanensis*, *peruviana*, *mexicana* e *pifanoi*, que estariam relacionadas a formas clínicas diversas da doença em diferentes regiões (PESSOA apud VALE; FURTADO, 2005).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde considerou as leishmanioses como a segunda doença causada por protozoários de maior importância em saúde pública (FURUSAWA; BORGES, 2014).

Hoje a leishmaniose constitui um conjunto complexo de doenças que apresentam características e peculiaridades diferentes decorrentes da multiplicidade de seus agentes etiológicos, vetores, reservatórios, fatores ambientais e a resposta imune disposta pelo hospedeiro em resposta ao protozoário e são classificadas em três manifestações principais: visceral (Calazar), mucocutânea e cutânea (tegumentar) (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; BRASIL, 2013; FURUSAWA; BORGES, 2014).

2.1.2. O Parasita

Os parasitas do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) são protozoários digenéticos (heteroxenos), que tem o seu ciclo biológico desenvolvido em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado (LAINSON; SHAW, 1979). Apresentam dois estágios evolutivos principais:

- (1) forma promastigota (com flagelo livre) que se desenvolve no aparelho digestivo do vetor e,
- (2) forma amastigota (intracelular, com flagelo rudimentar) que parasita o Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado infectado, reproduzindo-se no interior de macrófagos (GRIMALDI; TESH; McMAHON-PRATT, 1989) [Figura 01].

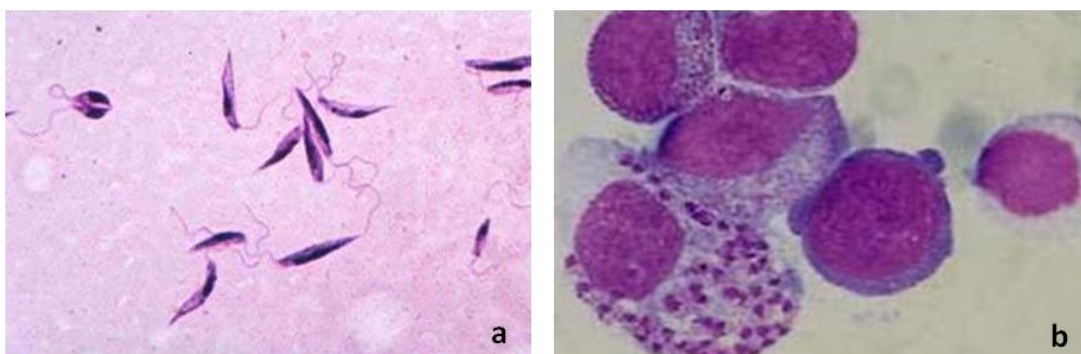


Figura 01- Formas promastigota (a) e amastigota intracelular (b) de *Leishmania*.

Fontes: www.parasitologia.icb.ufmg.br/www.medicina.ufmg.br/. Acesso em: 19 mai. 2014.

No Novo Mundo, o ciclo de transmissão de *Leishmania* ocorre em vários animais mamíferos (roedores, marsupiais, edentados, equinos, primatas e canídeos) que funcionam como verdadeiros reservatórios naturais do parasita e em insetos hematófagos flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) pertencentes a várias espécies e diferentes gêneros, dependendo da localização geográfica (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Existem aproximadamente 800 espécies de flebotomíneos catalogadas em todo o mundo, das quais mais de 120 ocorrem na Amazônia. Porém, somente 32 espécies de flebótomos têm sido implicadas na transmissão da leishmaniose humana (WHO, 1990; RANGEL; LAINSON, 2003).

O hospedeiro vertebrado adquire a infecção com a inoculação do parasita (forma promastigota metacíclica) durante o repasto sanguíneo. Os humanos e animais domésticos infectados com *Leishmania* são hospedeiros secundários e não desempenham papel importante no ciclo de transmissão, são considerados hospedeiros acidentais (Figura 02) [LAINSON, 1988].

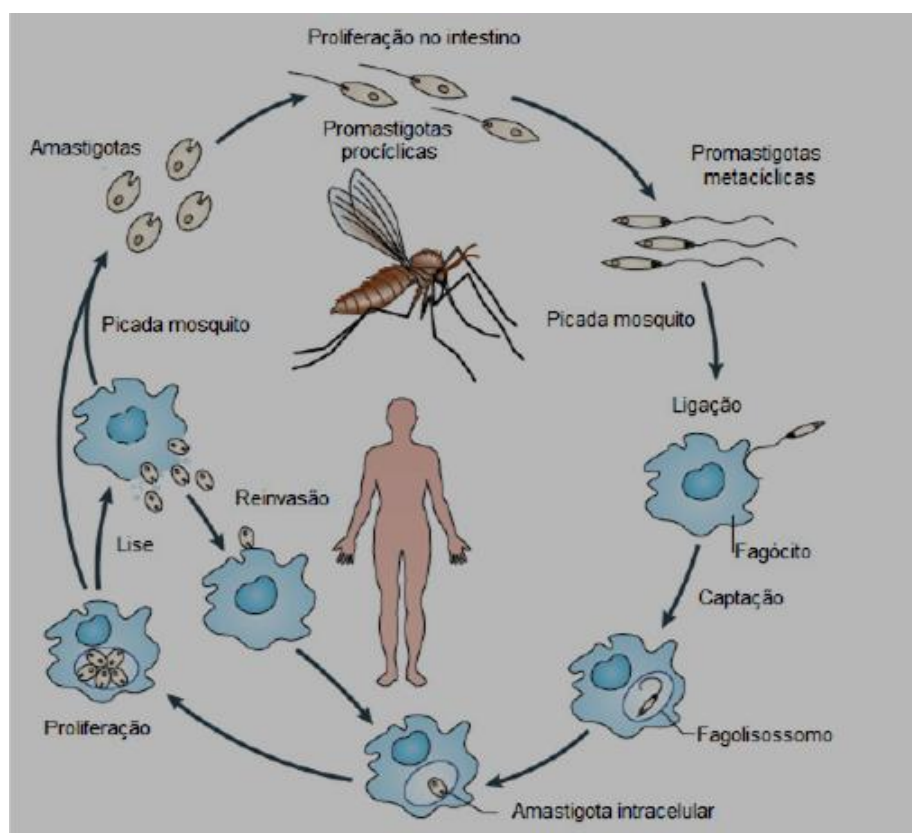


Figura 02- Ciclo de Transmissão da Leishmaniose (KAYE; SCOTT, 2011).

O modelo de transmissão da LTA transformou-se gradualmente durante as últimas décadas, passando de silvestre, primordialmente, para associação de silvestre, domiciliar e peridomiciliar (ARMIJOS et al., 1997; GUERRA et al., 2006; NEGRÃO; FERREIRA, 2009).

2.1.3. Determinantes da infecção: Interação *Leishmania* - macrófago

O estabelecimento da infecção humana pelas espécies de *Leishmania* tem seu início a partir da inoculação das formas promastigotas do parasita na pele, durante a hematofagia das fêmeas de flebotomíneos vetores (BRASIL, 2006; SILVEIRA et al., 2008). A partir desse momento, inicia-se uma complexa interação do parasita e a resposta imune do hospedeiro, ou seja, um processo de sobrevivência do parasita frente às defesas do organismo, que se vencido pelo parasita, resultará na sua fagocitose pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), como os macrófagos (VAN ZANDBERGEN et al., 2004; JOHN; HUNTER, 2008; LASKAY; VAN ZANDBERGEM; SOLBACH, 2008; PETERS et al., 2008).

De outro modo, de acordo com o modelo mais recente de interação *Leishmania* – neutrófilo - macrófago, as primeiras células que chegam ao sítio da infecção, atraídas por moléculas presentes na saliva do inseto vetor, são os neutrófilos, que funcionam como pontes entre os parasitas e os macrófagos (PETERS; SACKS, 2009; OLIVEIRA, 2010). Além disso, os neutrófilos secretam um nível elevado de MIP-1 β quimiocina, que é conhecida por atrair macrófagos para o local da infecção, indicando que a *Leishmania* pode usar neutrófilos como "cavalos de tróia" para entrar silenciosamente nos macrófagos (VAN ZANDBERGEN et al., 2004; PIMENTEL et al., 2016).

Após a infecção inicial, os neutrófilos e macrófagos são recrutados para o local da infecção desencadeando uma resposta inflamatória aguda inespecífica e a ativação do sistema complemento, da qual sua interação com os parasitas influenciará significativamente o resultado da infecção (RIBEIRO-GOMES et al., 2007). Ou seja, algumas das formas promastigotas metacíclicas infectantes conseguem resistir à ação lítica dos neutrófilos e do sistema complemento, por apresentarem na membrana plasmática moléculas de glicoconjugados e glicoproteínas, que impedem tanto a fixação de componentes do complemento (C3b e C3bi), como também, representam

uma barreira de proteção contra a lise celular (PUENTES; SACKS; JOINER, 1988; SACKS; BROCLIN; TURCO, 1990; SILVEIRA et al., 2008), sendo fagocitadas por macrófagos, e posteriormente, transformam-se em formas amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos dessas células (MURRAY et al., 2005; SILVEIRA et al., 2008).

Como *Leishmania* é um patógeno intracelular obrigatório, os macrófagos são indispensáveis para a sua sobrevivência, diferenciação e replicação por divisão binária, e a adesão do parasita à membrana do macrófago é mediada por receptores (receptor para molécula de manose-fucose, manose-6-fosfato, lipofosfoglicanos, gp63) da membrana do macrófago que se ligam às moléculas da membrana das promastigotas metacíclicas (CHANG, 1981; SILVEIRA et al., 2008; LIU; UZONNA, 2012). A utilização desses receptores promove baixo metabolismo oxidativo no macrófago, o que favorece a continuidade do seu ciclo biológico (BRASIL, 2006).

A adesão do parasita à membrana do macrófago é imprescindível para o processo de fagocitose. Diferentes moléculas do parasita têm sido estudadas e descritas como integrantes da membrana de superfície das leishmanias e consideradas potenciais fatores de virulência, tais como glicoproteínas (GP) e glicolipídios, fundamentais para sua interação com os macrófagos, sendo a GP63, o lipofosfoglicano (LPG) e mais recentemente, o E-NTPDases (ecto-nucleósideo trifosfato difosfohidrolases) importantes moléculas ligantes (SANTOS et al., 2009; PIMENTEL et al., 2016).

Em seguida, essa interação determina uma série de reações bioquímicas que podem levar à ativação ou à inibição das funções da célula hospedeira. Essa ativação caracteriza-se pela deflagração de processos oxidativos (sistema microbicida dependente de oxigênio) e produção de óxido nítrico. Desse modo, durante a fagocitose, os grânulos lisossomais das células fundem-se aos vacúolos parasitóforos formados, resultando em uma modificação do seu microambiente, induzindo à transformação da forma promastigota para amastigota, facilitando sua sobrevivência, pois, sob essa nova forma, o parasita apresenta-se mais resistente e desencadeia menor resposta oxidativa da célula hospedeira, e conseqüente replicação, disseminando a infecção (MURRAY, 1981; BRASIL, 2006; SILVEIRA et al., 2008).

A partir de então, a evolução da infecção e a definição da patogenia estão sujeitas ao perfil imunogenético do homem, intensamente associado à resposta imune celular, e da virulência da espécie de *Leishmania* infectante, da qual resultarão as

diferentes formas clínicas da LTA (SILVEIRA et al., 2004; LIU; UZONNA, 2012; PIMENTEL et al., 2016).

2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma doença infecciosa de evolução crônica, causada por diferentes espécies de parasitas, caracterizada principalmente pelo comprometimento do tecido cutâneo e, secundariamente, dependendo da espécie de *Leishmania* e de fatores imunogenéticos do hospedeiro, por lesão do tecido mucoso nasofaríngeo, manifestando diferentes formas clínicas descritas a seguir: a Leishmaniose Cutânea (LC) e a Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM). Outros tipos de manifestação de importância são: a forma disseminada e a forma difusa (NEVES, 2004; SILVEIRA et al., 2008; BRASIL, 2017).

A Leishmaniose Cutânea (LC) apresenta úlcera típica indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele, com formato arredondado ou ovalado, medindo de alguns milímetros até alguns centímetros, com base eritematosa, infiltrada e de consistência firme. As bordas são bem delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2017).

Outros tipos de lesões cutâneas também podem ser encontrados. As lesões iniciais costumam apresentar-se nodulares, localizadas profundamente na hipoderme, ou pequenas pápulas, semelhantes à picada de inseto, que evoluem aumentando em tamanho e profundidade (lesões papulo-tuberosas) e ulcerando no vértice. As lesões vegetantes caracterizam-se pelo aspecto papilomatoso, úmido e de consistência mole; já as lesões verrucosas caracterizam-se por superfície seca, áspera, com presença de pequenas crostas e de descamação. Esses dois tipos de lesões podem ser primários ou evoluir a partir de úlceras. Ao redor da lesão principal, poderão surgir endurecimento subcutâneo e pápulas satélites, que podem coalescer formando placas. Novas lesões de LC podem surgir em áreas traumatizadas. A linfangite nodular, com ou sem linfadenopatia regional, quando presente, costuma estar recoberta por pele íntegra ou eritematosa (forma esporotricóide). Eventualmente, pode haver formação de úlceras no trajeto, porém não é comum observar a formação de gomas, com supuração e fistulização das lesões (GUIMARÃES et al., 2005; BRASIL, 2017) [Figura 03].



Figura 03- Polimorfismo das lesões de Leishmaniose Cutânea.

Fonte: Naiff Jr et al. (2009); Espir et al. (2016).

A Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM) representa 3 a 5% dos casos de LC que progredirão para a lesão mucosa. Geralmente a lesão é indolor e destrutiva, iniciando-se no septo nasal anterior, que é cartilaginoso e de fácil visualização. Algumas vezes a úlcera primária ainda pode ser observada quando surgem às lesões mucosas, em outras vezes o acometimento mucoso surge até 10 anos depois a inoculação do parasita. Acredita-se que a disseminação metastática ocorra por via hematogênica ou linfática. Normalmente, surge após a cura clínica da LC (SILVEIRA et al., 2008; VERONESI; FOCACCIA, 2015).

Atualmente existem cerca de 30 espécies de *Leishmania* descritas, sendo 10 no Velho Mundo e 20 no Novo Mundo. Dentre essas 21 causam a doença no homem. Nas Américas, 13 espécies são conhecidas, destas sete causam leishmaniose cutânea no Brasil (RANGEL; LAISON; 2003).

A LTA na Amazônia pode ser ocasionada por sete espécies de leishmanias, seis do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (L.)*

amazonensis. Dentre essas, até o momento, as de maior importância no estado do Amazonas são: *L. (V.) guyanensis* e a *L. (V.) naiffi*, seguidas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (MOTA; MIRANDA, 2011; BRASIL, 2017).

A *L.(V.) guyanensis* é a segunda espécie mais prevalente no Brasil, sendo uma das mais comuns na região amazônica. A endemia associada a este patógeno incide em focos rurais e urbanos, sendo a doença comum em jovens do sexo masculino, que trabalham no campo (FIGUEIRA et al., 2008). Apresenta múltiplas lesões, e raramente lesões nas mucosas (OURIVES-NEVES et al., 2011; BRASIL, 2017).

Há poucos relatos de infecção por *L. (V.) naiffi*, sugerindo que sua ocorrência é incomum e os casos relatados apresentam um curso clínico benigno e uma boa resposta ao tratamento. Os poucos casos descritos na literatura geralmente associam *L. (V.) naiffi* com baixas taxas de virulência em humanos. As lesões cutâneas são geralmente ulceradas, pequenas e localizadas nas mãos, braços ou pernas (PRATLONG et al., 2002; FAGUNDES-SILVA et al., 2015). Até o momento, nenhuma associação entre *L. (V.) naiffi* e leishmaniose mucosa tem sido observada. Está associada com tatus (*Dasypus novencintus*), em florestas primárias na região amazônica. Seus vetores são *Lutzomyia davisii*, *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. ayrozai* (LAINSON et al., 1990; YOUNG; DUNCAN, 1994).

A *L. (L.) amazonensis* é responsável pelos casos de leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa, e por uma forma sem tratamento conhecida por leishmaniose cutânea difusa anérgica (SILVEIRA et al., 2008), sendo encontrado ao norte e ao sul do rio Amazonas. Segundo Rangel e Lainson (2003) é a única espécie do subgênero *Leishmania* que causa LC no Brasil, com distribuição geográfica relativamente ampla nas Américas. Tem como principal vetor o *Lu. flaviscutellata*, um flebotômíneo de hábito noturno e pouco antropofílico (BRASIL, 2017).

A *L. (V.) braziliensis* causa lesões cutâneas e mucosas, estende-se de Norte a Sul do Brasil em áreas de colonização recente e antiga. Está relacionada com animais domésticos, como cavalos e cães. Sua transmissão está associada ao vetor *Lu. wellcomei* em florestas primárias no Pará e Sul da Bacia Amazônica (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; MOTA; MIRANDA, 2011).

Deve-se considerar o caso de LC como um todo, pela ocorrência do parasita, das condições particulares de cada indivíduo e do estado de seu sistema imune. A resultante desta associação é que determinará a evolução da doença (BRASIL, 2017).

2.3 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana

Endêmica em quatro dos sete continentes, a LTA ocorre em regiões tropicais e subtropicais. Tem sido descrita em quase todos os países americanos, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (VIEIRA et al., 2007) [Figura 04]. Sobrevém com frequência nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, devido às mudanças socioeconômicas e comportamentais como, por exemplo, êxodo rural, desemprego, guerra, etc., tornando cada vez mais difícil a implantação dos programas de controle (MOTA; MIRANDA, 2011; OMS, 2012).

Do total de casos de LTA, 90% ocorrem em apenas 10 países, sendo os principais: Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão, no Velho Mundo; Brasil e Peru, no Novo Mundo (OMS, 2012).

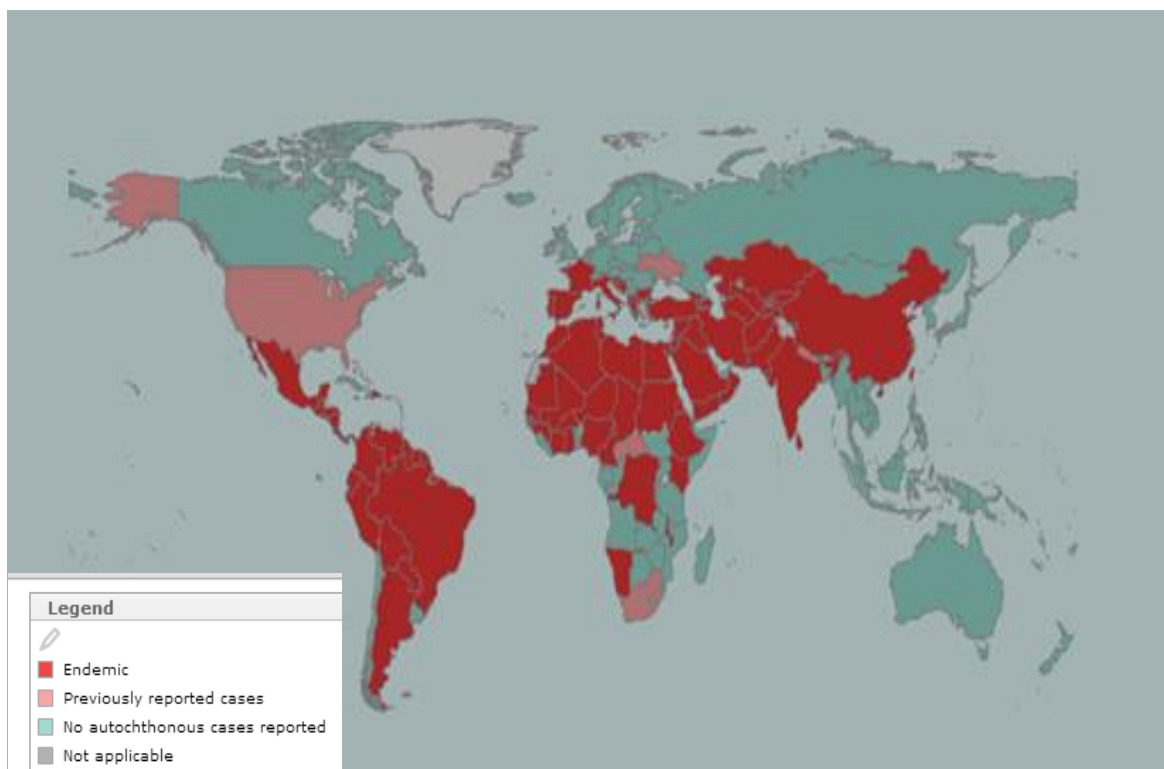


Figura 04- Distribuição Mundial da Leishmaniose Cutânea (2013).
Fonte: WHO (2013)

O Brasil encontra-se entre os cinco países com maior número de casos desta endemia nas Américas, representando um grave problema de saúde pública, com ampla distribuição por todas as regiões geográficas (ALVAR, 2012). No período de 2010 a 2015 foram registrados, em média, 20.798 casos/ano, distribuídos em todas as Unidades Federativas do Brasil, com destaque para as regiões norte e nordeste (SINAN/SVS/MS, 2017).

Os coeficientes médios mais elevados foram registrados na região Norte (61,02/100.000 habitantes), seguidos das regiões Centro-Oeste (21,65/100.000 habitantes) e Nordeste (15,07/100.000 habitantes), conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1- Taxa de incidência de LTA entre os anos de 2006 a 2012, nas regiões do Brasil.

Região	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
TOTAL	11,58	11,46	10,64	11,38	11,59	11,08	11,86	11,37
Região Norte	57,71	64,94	57,23	53,63	45,18	53,51	61,07	56,15
Região Nordeste	11,63	11,59	11,65	12,94	17,03	14,83	15,07	13,55
Região Sudeste	3,42	2,47	2,06	2,02	3,15	2,65	1,65	2,49
Região Sul	2,05	1,94	2,39	1,60	0,91	1,21	1,54	1,66
Região Centro-Oeste	27,62	23,32	22,04	32,60	22,18	16,01	21,65	23,57

Fonte: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde, 2013.

Já em 2013 foram mais de 18 mil casos registrados na região Norte, sendo o Amazonas considerado o 5º estado com maior número de casos registrados (1.302) e 2014 mais de 1.500 casos já haviam sido registrados (FVS, 2015). A incidência de Leishmaniose no Amazonas ainda é expressiva, devido à abertura de novas estradas, instalação de novos núcleos residenciais, onde previamente existia densa floresta tropical e com treinamento de militares na selva (TALHARI et al., 1988; GUERRA et al., 2003; PINHEIRO, LUZ; FRANCO, 2008).

Surtos da doença geralmente ocorrem em áreas de desmatamento recente, para ocupação da terra por posseiros, edificação de estradas, instalação de frentes de trabalho, organizações militares em treinamento de selva, caçadores, implantação de assentamentos rurais e população indígena que habita a floresta de áreas endêmicas (BRASIL, 2013).

A Organização Mundial de Saúde definiu que a luta contra a leishmaniose deve ser parte da atenção primária a saúde, destacando as responsabilidades de esferas locais e federais, e da população em geral, para o combate da expansão da doença e o controle da mesma (WHO, 1990).

2.4 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana

O arsenal terapêutico medicamentoso disponível para tratamento da LTA, assim como de outras doenças tropicais é bastante precário. Historicamente, o padrão-ouro da terapia sistêmica dessa doença é com antimoniais pentavalentes (MANSUETO et al., 2014), mas outras opções terapêuticas foram adotadas ao longo dos anos, incluindo Pentamidina, Anfotericina B e Miltefosina (CHRUSCIAK TALHARI, 2009; CROFT; OLLIARO, 2011; BRASIL, 2013; 2017; CDC, 2016), como mostra a tabela 2.

A decisão sobre qual terapêutica adotar deve ser individualizada e a abordagem vai depender da espécie de *Leishmania* identificada, área geográfica em que a infecção foi adquirida, da história natural da infecção, o risco de desenvolver a forma mucosa da doença, da faixa etária, das características clínicas das lesões e da susceptibilidade aos medicamentos (SILVEIRA et al., 2008; OURIVES-NEVES et al., 2011; CDC, 2016; BRASIL, 2017).

Tabela 2- Drogas mundialmente utilizadas para o tratamento atual da Leishmaniose Tegumentar Americana, isoladas ou coadministradas.

Droga	Produto comercial	Mecanismo de ação	Vantagens	Limitações	Custo
Antimônio Pentavalente	Glucantime® (Antimoniato de Meglumina) Pentostam® (Estibogluconato de Sódio)	Atua como pró-droga, inibe tripanotiona redutase, aumenta ERO; inibe a biossíntese de macromoléculas em amastigotas.	Baixo custo e alta disponibilidade	Resistência parasitária, especialmente na Índia; Tratamento longo (até 30 dias), por vias IM/EV; Efeitos cardiotoxicos e nefrotóxicos.	1,30 – 7,97 U\$
Pentamidina	Pentacarinat® (Isetionato de pentamidina)	Inibe a topoisomerase II mitocondrial e o processo de transcrição.	Eficaz na terapia de combinação, usado em caso de resistência ao antimonial.	Tratamento EV, efeitos adversos gastrointestinais, hipotensão, indução de diabetes mellitus.	7,2 – 9,3 U\$
Anfotericina B	Abelcet® (complexo lipídico)	Formam complexos com esteróis da membrana plasmática do parasita, aumentando a permeabilidade, resultando em morte celular.	Alta eficácia, usada em caso de resistência ao antimonial;	Tratamento hospitalar longo (28 dias), por via EV; Doses limitadas devido à toxicidade renal; Efeitos adversos, náusea, vômitos, diarreia, hipocalemia, alterações hepáticas e renais. Alto custo;	6,6 – 11,28 U\$
	Amphocii® (Dispersão coloidal)	Droga com entrega direcionada em macrófagos infectados e conseqüente morte parasitária.	Lipossomal: menos nefrotóxica que a convencional	Lipossomal: alto custo. Exige manutenção da temperatura.	23 – 77,5 U\$
	AmBisome® (lipossomal)				
Miltefosina	Impavido®	Modula receptores de superfície celular e do metabolismo do inositol dos parasitas, inibe o citocromo C oxidase.	Apresentação oral	Alto custo; Droga anticâncer; Tratamento longo de 28 dias; Eficaz apenas contra três espécies de <i>Leishmania</i> (<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i> e <i>L. guyanensis</i>); Medicamento não está registrado em muitos países endêmicos e, conseqüentemente, não estão disponíveis; Toxicidade gastrointestinal, hepática e renal; Teratogênica em animais experimentais.	23 – 77,5 U\$

ERO: espécie reativa de oxigênio. IM: intramuscular. EV: endovenoso

Fonte: Adaptado de OPAS (2013); Mears et al. (2015); Singh et al. (2016); DNDi (2016).

Atualmente, após várias evidências clínicas, o tratamento da doença no Brasil segue as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a realidade das Américas, devendo considerar a espécie da *Leishmania* infectante, restringindo-se a drogas de primeira e segunda escolha (BRASIL, 2017), conforme os protocolos descritos a seguir nos Quadros 1 e 2:

Quadro 1- Opções de tratamento para a forma cutânea localizada de leishmaniose tegumentar causada pela *Leishmania braziliensis* e por outras espécies de *Leishmania*, exceto *Leishmania guyanensis*.

Leishmaniose Cutânea Localizada – Pacientes infectados por <i>Leishmania braziliensis</i> e outras espécies, exceto <i>L. guyanensis</i>.	
Forma clínica	Terapêutica
Lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização	<p>Primeira escolha</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de Meglumina EV ou IM: para pacientes de todas as regiões brasileiras, exceto aqueles com comorbidade renal, hepática ou cardíaca, gestantes e com idade maior ou igual a 50 anos. • Anfotericina B lipossomal: para pacientes com idade a partir de 50 anos; com insuficiência renal, cardíaca ou hepática de qualquer idade; transplantados renais, cardíacos ou hepáticos; gestantes de qualquer idade. <p>Segunda escolha</p> <ul style="list-style-type: none"> • Desoxicolato de anfotericina B. • Isetionato de pentamidina, exceto em gestantes e lactantes.
Lesão única com até 3 cm no seu maior diâmetro, em qualquer localização, exceto cabeça e regiões periarticulares, incluindo recidiva cútis e sem imunossupressão.	<p>Primeira escolha</p> <ul style="list-style-type: none"> • Todas as indicações de primeira escolha recomendadas para lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização. • <u>Outra opção:</u> antimoniato de meglumina intralesional. <p>Segunda escolha</p> <ul style="list-style-type: none"> • Todas as indicações de segunda escolha recomendadas para lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização.

Fonte: SVS/MS

Quadro 2- Opções de tratamento para a forma cutânea localizada de leishmaniose tegumentar causada pela *Leishmania guyanensis*.

Leishmaniose Cutânea Localizada – Pacientes oriundos de áreas onde há predomínio de <i>Leishmania guyanensis</i> .	
Forma clínica	Terapêutica
Lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização	<p>Primeira escolha</p> <ul style="list-style-type: none"> • Isetionato de pentamidina: para todos os pacientes, exceto os com comorbidade renal, hepática ou cardíaca, diabéticos, gestantes, lactantes. • Anfotericina B lipossomal: insuficiência renal, cardíaca e hepática; transplantados renais, cardíacos e hepáticos; gestantes, e para pacientes com idade a partir de 50 anos. <p>Segunda escolha</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de Meglumina. • Desoxicolato de anfotericina B.
Lesão única com até 3 cm no seu maior diâmetro, em qualquer localização, exceto cabeça e regiões periarticulares, incluindo recidiva cútis e sem imunossupressão.	<p>Primeira escolha</p> <ul style="list-style-type: none"> • Todas as indicações de primeira escolha recomendadas para lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização. • <u>Outra opção:</u> antimoniato de meglumina intralesional. <p>Segunda escolha</p> <ul style="list-style-type: none"> • Todas as indicações de segunda escolha recomendadas para lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização.

Fonte: SVS/MS

2.4.1 Antimoniais Pentavalentes

Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a OMS recomenda que a dose de Antimoniato de Meglumina seja calculada em mg/Sb⁵⁺/kg/dia por 20 a 30 dias, por via parenteral (intramuscular ou endovenosa), havendo dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®] Sanofi, Aventis) e o Estibogluconato de sódio (Pentostan[®] Glaxo, Smith Kline), sendo este último não comercializado no Brasil (BERMAN, 1988; BRASIL, 2017). A figura 05 ilustra as estruturas químicas destes compostos.

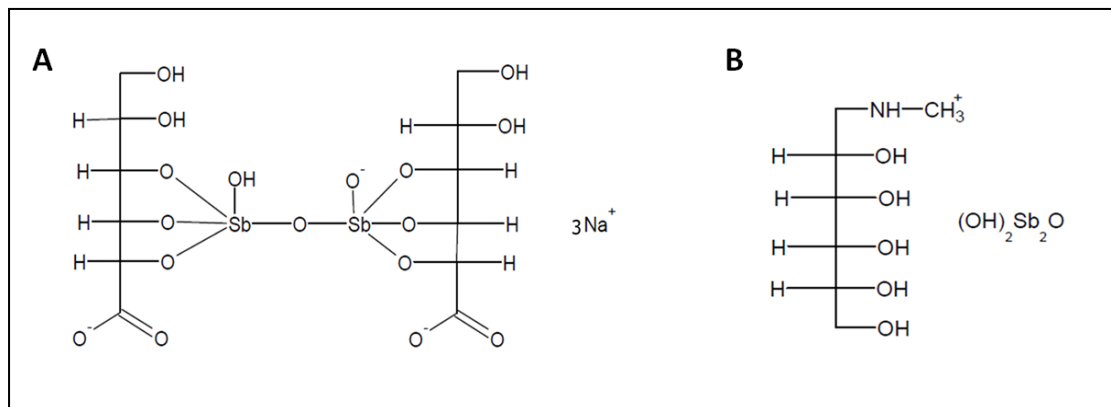


Figura 05- Estrutura química dos antimoniais pentavalente. (A): Estibogluconato de Sódio e (B) Antimoniato de Meglumina.
Fonte: JENSEN (2016). Chemdraw[®].

O Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®]) é comercializado em frasco de 5 mL que contem 1,5 g do antimoniato bruto, correspondente a 405 mg de Sb⁵⁺. Portanto, cada mL contém 81 mg de Sb⁵⁺. Não deve ser usado por gestantes, pois atravessa a barreira transplacentária e pode impregnar no tecido nervoso do feto, levando a síndromes severas de retardamento mental, e nem por pacientes cardíacos. O Ministério da Saúde brasileiro distribui gratuitamente o medicamento através da rede pública de saúde (BRASIL, 2013).

Apesar de o antimônio pentavalente ser menos tóxico que o trivalente, os medicamentos apresentam importantes efeitos colaterais, tais como dor no local da injeção, pancreatite, náuseas, vômitos, mialgias, artralgia, plenitude gástrica, pirose, dor abdominal, cefaleia, tontura, palpitação, alterações das enzimas hepáticas, alterações eletrocardiográficas, toxicidade cardíaca e renal, podendo ocorrer morte súbita (CROFT; COOMBS, 2003; SILVA, 2012; BRASIL, 2013).

A droga é rapidamente absorvida e mais que 80% da dose administrada é excretada dentro de 24h após aplicação, por via renal, na forma inalterada. A eliminação ocorre em duas fases. Na primeira, a meia-vida é pequena e aproximadamente de duas horas, e na segunda fase, a meia-vida é mais lenta, cerca de 76h. Devido à rápida eliminação, altas doses de antimônio pentavalente em regime contínuo garantem sua quantidade adequada nos sítios de ação (BULA GLUCANTIME[®], 2010).

A eficácia do Antimoniato de Meglumina no tratamento da LC varia segundo a região geográfica, a espécie de *Leishmania* envolvida e a apresentação clínica da

doença. No Brasil, a falha terapêutica foi observada em 29% dos pacientes (TUON et al., 2008), na Bolívia em 7% dos pacientes (BERMUDEZ et al., 2006), na Colômbia em 39% dos pacientes (PALACIOS et al., 2001) e no Peru a falha terapêutica variou de 8,3 a 30,4% dependendo da espécie de *Leishmania* (AREVALO et al., 2007).

Embora não seja fatal, a LC é tratada para acelerar a cura, reduzir as lesões e prevenir a disseminação do parasita ou as recaídas. As dificuldades quanto à administração e a duração do tratamento (aplicações diárias por longo tempo), paralelamente aos efeitos colaterais e o crescente número de relatos de casos de resistência de cepas de *Leishmania* aos compostos antimoniais pentavalente têm estimulado pesquisadores do mundo todo a buscar novas formas farmacêuticas para este fármaco (MARSDEN, 1986; SUNDAR, 2001; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; SINGH et al, 2016).

2.4.1.1 Mecanismo de Ação dos Antimoniais

Em 1912, o cientista brasileiro Gaspar Vianna demonstrou que o tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio trivalente) determinava uma rápida cicatrização das lesões cutâneas. Somente a partir da década de 40, o uso clínico do antimônio trivalente foi descontinuado por causa dos seus severos efeitos colaterais e pela descoberta de compostos menos tóxicos, os complexos de antimônio pentavalente (Sb^{5+}) [BERMAN, 2003; MIRANDA, 2011]. E apesar de ser empregado há muitos anos no tratamento das leishmanioses o mecanismo de ação desses fármacos não está completamente esclarecido, mas acredita-se que:

- os antimoniais pentavalente exercem pouco efeito sobre as formas promastigotas em culturas axênicas, havendo contraste entre as atividades *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que para exercer a atividade leishmanicida é necessária a redução de Sb^{5+} para Sb^{3+} , sendo portanto, pró-drogas, e que dessa forma, interferiria no metabolismo dos tióis (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004);
- o Sb^{3+} parece interferir em enzimas-chave do metabolismo energético das formas amastigotas de *Leishmania*, levando à depleção de ATP intracelular (BERMAN; GALLALEE; BEST, 1987);

- há apoptose de amastigotas tratadas com Sb^{3+} , envolvendo fragmentação do DNA e externalização de fosfatidilserina (SERENO et al., 2001; SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003);
- somente as formas amastigotas são capazes de reduzir Sb^{5+} para Sb^{3+} (SHAKED-MISHAN et al., 2001); outra hipótese sugere que a redução do Sb^{5+} ocorra no macrófago (SERENO et al., 1998), sendo possível que a redução ocorra em ambos;
- os antimoniais pentavalente passam por uma dissociação para que o antimônio exerça sua atividade (DEMICHELI; FRÉZARD, 2005);

Portanto, de acordo com a hipótese de que Sb^{5+} é reduzido para Sb^{3+} na célula, foi demonstrado que a glutatona (GSH), principal tiol encontrado nas células dos mamíferos, pode estar envolvida nesse processo (FRÉZARD et al., 2001; FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003). Ressalva-se ainda que duas enzimas parasitárias, nomeadas redutase tiol dependente (TDR1) e arsenato redutase (ACR2), mostraram-se capazes de converter Sb^{5+} a Sb^{3+} dentro da célula, sugerindo a possível participação de enzimas do parasita nesse processo (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004; CABALLERO, SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014).

A participação do parasita no metabolismo dos antimoniais foi sugerida a partir dos maiores níveis de Sb^{3+} encontrados em hamsters experimentalmente infectados quando comparado àqueles tratados sem infecção. Sugere-se que nos meios biológicos Sb^{3+} interagiria com os grupos sulfidrilas de certas proteínas, resultando na perda de sua função (DEMICHELI et al., 2002; DEMICHELI; FRÉZARD, 2005).

Além disso, também foi demonstrado por DEMICHELI et al. (2002) que Sb^{5+} forma complexos com ribonucleosídeos, e que essa interação poderia ter implicações no mecanismo de ação dos antimoniais, pois a formação desses complexos poderia estar relacionada com a interferência dos antimoniais pentavalente no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita e na depleção dos níveis de ATP intracelular (RATH et al., 2003). Na imagem a seguir (Figura 06) pode ser observado o esquema das hipóteses descritas para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes.

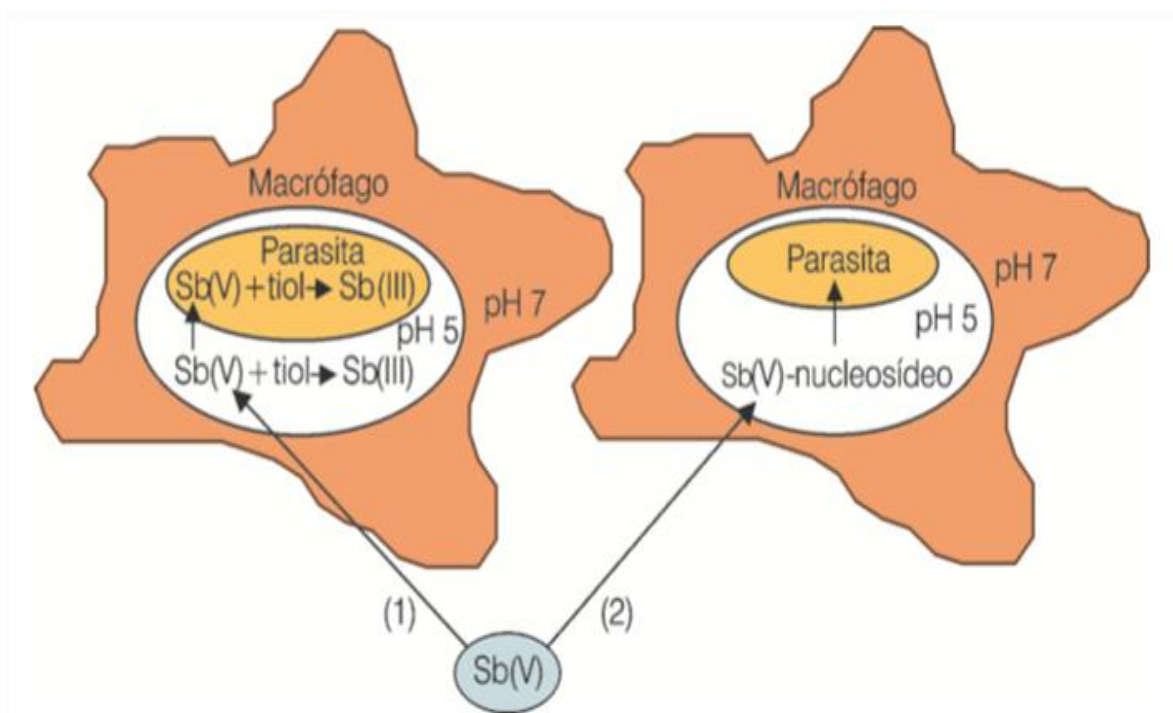


Figura 06- Modelos propostos por Demicheli e Frézard (2005) para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalente. (1) envolve a redução de Sb^{5+} para Sb^{3+} pelos tióis; (2) envolve a formação de complexo Sb^{5+} - ribonucleosídeo. Fonte: DÉMICHELI; FRÉZARD (2005).

2.4.1.2 Resistência ao tratamento com Antimoniais Pentavalente

É preocupante a ocorrência de resistência medicamentosa aos antimoniais pentavalentes (20 mg/ Sb^{5+} /kg/dia por via intramuscular ou endovenosa por 30 dias). Em Bihar e Nepal (Índia), por exemplo, o percentual é de 60% e 24%, respectivamente para a LV, (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; SINGH et al., 2016). Por conseguinte, o antimonial pentavalente não é mais recomendado na Índia.

Nas Américas tem aumentado a preocupação quanto à refratariedade das formas de LC e LM ao tratamento (LLANOS-CUENTAS et al., 2008; BRUSTOLONI et al., 2010). No Brasil, estudos em áreas endêmicas para LC revelam que a taxa de cura definitiva para pacientes tratados com Sb^{5+} é até 60%, sugerindo a resistência a este fármaco (MACHADO et al., 2010; OURIVES-NEVES et al., 2011; CHRUSCIAK-TALHARI et al., 2011; INOCENCIO DA LUZ et al., 2011).

Diversos autores citam os mecanismos prováveis dessa resistência: a redução da transformação do Sb^{5+} em Sb^{3+} , a formação de conjugado entre o Sb e o tiol intracelular (tripanotona) por conjugase/transferase não identificadas e a extrusão do

Sb pelo elevado nível de transportadores de efluxo do tipo ABC (HAIMEUR et al., 2000; DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Além disso, o tratamento inadequado ou subdose da terapia por pacientes em locais com focos endêmicos podem resultar no aparecimento de *Leishmania* com baixa sensibilidade aos antimoniais pentavalentes (LUCUMI et al., 1998). Também a inerente resistência do parasita ao antimonial ou defeitos sutis na farmacocinética ou sistema imune do hospedeiro pode ser importante (BERMAN, 1988).

Não é sabido se a resistência medicamentosa parasitaria é genética ou adquirida pela falta de susceptibilidade intrínseca para subpopulações de parasitas e essa resistência ao antimônio leva longo tempo para surgir, sugerindo que várias mutações são requeridas para encontrar um fenótipo resistente, mas a resistência aos antimoniais é temível (LIMA et al., 2007; BRAGA, 2012).

Nos últimos anos, estão sendo reintroduzidos com o benefício de novas formulações ou regimes de dosagem. Esse grupo é representado, principalmente, pela Pentamidina e Anfotericina B (CDC, 2016).

2.4.2 Isetionato de Pentamidina

O Isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) tem sido usado no tratamento de leishmanioses há mais de 40 anos em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano. Classicamente a dose recomendada para as diferentes manifestações clínicas é de 4 mg/kg/dia por via intramuscular profunda ou via endovenosa, em dois em dois dias, recomendando-se não ultrapassar a dose total de 2 g, pois esse medicamento tem ação no metabolismo da glicose e pode causar diabetes nos pacientes (BRASIL, 2017).

Esta substância é uma diamidina aromática (Figura 07) de eliminação lenta, depositando-se principalmente no fígado e nos rins. Este fármaco interfere com a síntese de DNA da *Leishmania*, modificando a morfologia do cinetoplasto e promovendo a fragmentação da membrana mitocondrial e também interfere no metabolismo das purinas, matando o parasita (GOTO; LINDOSO, 2010).

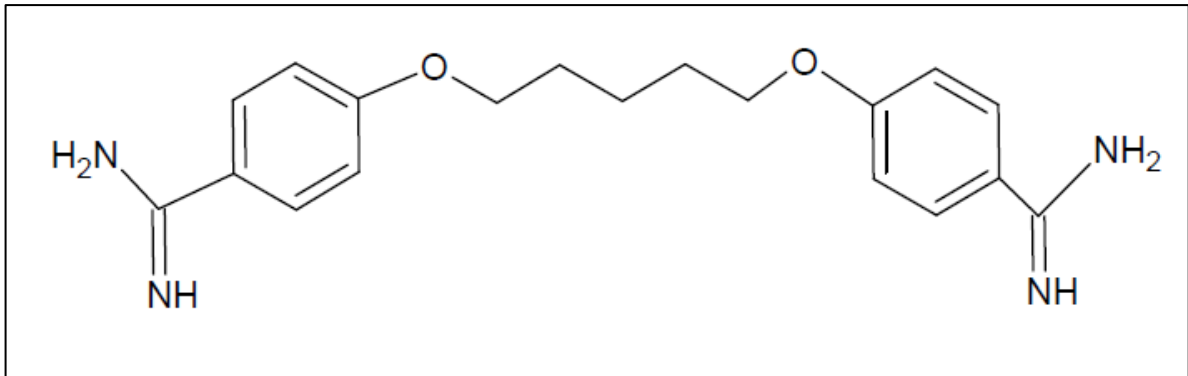


Figura 07- Estrutura química da Isetionato de Pentamidina.
Fonte: JENSEN (2016). Chemdraw[®].

Como efeitos colaterais da droga observam-se: dor, enduração e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, mialgia, cefaléia, hipotensão, lipotímia, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (DAVID; CRAFT, 2009; BRASIL, 2017).

2.4.3 Anfotericina B

A Anfotericina B (Abelcet[®]) [Figura 08] é um antibiótico antifúngico utilizado no tratamento das Leishmanioses na dose de 1 mg/kg/dia, por infusão endovenosa, diariamente ou em dias alternados, não excedendo a dose de 50 mg por aplicação. Deve ser administrada até atingir as doses totais de 1 a 1,5 g (forma cutânea) e 2,5 a 3 g (forma mucosa) [BRASIL, 2017].

Sua atuação se dá nas formas amastigotas e promastigotas de leishmanias, atuando no ergosterol presente na membrana. Com o aumento da permeabilidade da membrana celular ocorre um influxo de íons, levando o parasita à morte. É considerada como droga de primeira escolha no tratamento de gestantes e de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso (GOTO; LINDOSO, 2010).

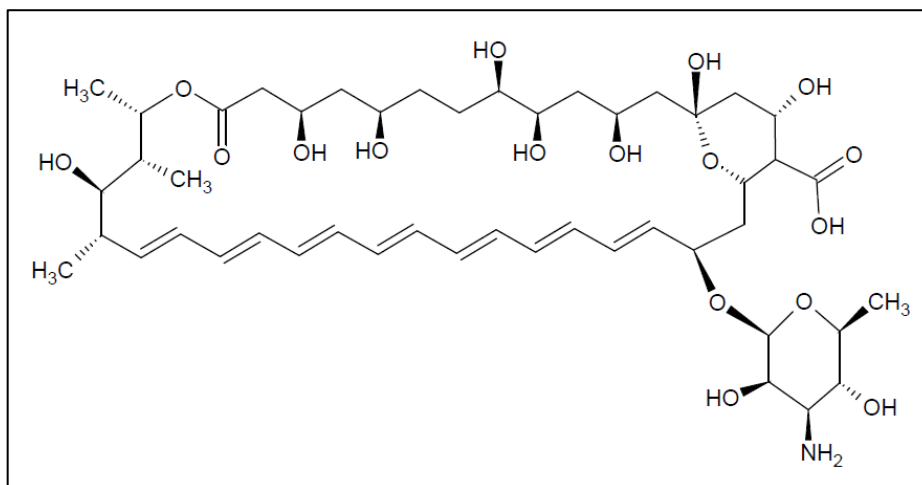


Figura 08- Estrutura química da Anfotericina B.
Fonte: JENSEN (2016). Chemdraw®.

Apresenta diferentes efeitos adversos, sendo os mais frequentes: febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão, podendo apresentar também anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (BRASIL, 2013; SINGH et al., 2016).

2.4.4 Anfotericina B lipossomal

A Anfotericina B lipossomal (AmBisome®) é uma nova formulação, na qual o fármaco é incorporado em lipossomas compostos por fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol, o que reduz a toxicidade do fármaco, como também aumenta a eficiência e a concentração nos tecidos (SANTOS et al., 2008; BRASIL, 2017).

No Brasil, esta droga é recomendada principalmente para uso no tratamento da LV, mas também é utilizada para tratar LTA segundo novo protocolo do Ministério da Saúde, na dose de 1 a 4 mg/Kg/dia diariamente por infusão venosa, em dose única, sem limite de dose diária, até atingir as seguintes doses totais de 1 – 1,5 g (forma cutânea) e 2,5 a 3 g (forma mucosa) [PELLISSARI et al., 2011; BRASIL, 2017].

A ação do medicamento ocorre através da sua ligação com esteróis na membrana celular, alterando a parede celular e permitindo a passagem de vários tipos de moléculas pequenas. Os efeitos adversos mais frequentes são febre, náuseas, vômitos, cefaléia, calafrios, flebite no local da infusão e dor lombar. Outros efeitos

adversos importantes são anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (BRASIL, 2013). Ainda que seja muito eficaz, essa droga é considerada tóxica e está associada a efeitos colaterais graves, além do alto custo, limitando o uso dessa formulação.

2.5 Drogas Alternativas no Tratamento da Leishmaniose

Segundo a literatura, outros fármacos têm sido sugeridos como formas alternativas para o tratamento da LTA, como a Paromomicina, Miltefosina, Alopurinol, Azitromicina, Pentoxifilina, além de associações destes fármacos com a terapêutica convencional (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; ALMEIDA; SANTOS, 2011; DORLO et al., 2012).

A Paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo identificado como tendo ação leishmanicida na década de 60, onde obteve bons resultados quando administrada por via tópica (EL-ON; SNEIER; ELIAS, 1992). Outras formulações de Paromomicina envolvendo diferentes veículos também foram testadas obtendo resultados variáveis, inconclusivos ou conflitantes (GARNIER; CROFT, 2002; IRAJI; SADEGHINIA, 2005; BAILEY; LOCKWOOD, 2007; AGUIAR et al., 2009; BEN SALAH et al., 2009; SINGH et al., 2016). Essa droga tem a ação de inibir a síntese de proteína, alterar a fluidez da membrana e sua permeabilidade, quando administrada de forma parenteral ou intralesional, mas é ineficiente quando aplicada sozinha, pois apresenta melhor desempenho em sinergismo com outras drogas (MALTEZOU, 2010). Em contrapartida a Paromomicina não afeta as células do hospedeiro mamífero, o que diminui a ocorrência de efeitos adversos (FERNANDEZ; MALCHIODI; ALGRANATI, 2011).

Outra opção é a Miltefosina, um alquil-fosfolípido originalmente desenvolvido para o tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários (ALMEIDA; SANTOS, 2011). Foi lançado no mercado como uma opção racional de fármaco a ser usado no tratamento oral da leishmaniose visceral na Alemanha e da leishmaniose cutânea na Colômbia (CROFT; COOMBS, 2003; SEIFERT et al., 2007), e em pacientes que não respondem a terapia com antimonial. Apesar de mostrar boa eficácia em países do Velho Mundo, é muito cara e tem uma longa vida no organismo (SUNDAR; MURRAY, 2005). Essa droga age interferindo na membrana celular do

parasita, sem interagir com o DNA parasitário, modulando a composição dos lipídios, permeabilidade e fluidez da membrana, como ocorre com o metabolismo de fosfolipídios, o que induz a morte celular por apoptose (SAMPAIO; LUCAS; FILHO, 2009). Apresenta efeitos adversos relacionados aos distúrbios gastrointestinais, como náusea, vômito e diarreia (SOTO et al., 2004; 2008).

O Alopurinol é um análogo da hipoxantina, também administrado oralmente e apresenta baixa toxicidade sistêmica nos ensaios terapêuticos da LTA. Porém, há diversos relatos de casos em que este fármaco não foi eficaz no controle da infecção por *Leishmania* spp (RATH et al., 2003). A sua utilização pode ser associada ou não ao antimonial, e seus efeitos secundários são poucos frequentes, apesar da exigência de uma monitorização constante da função renal e hepática a pacientes sujeitos a tratamentos prolongados (MOMENI; AMINJAVAHERI, 2003).

A Azitromicina é um antibiótico usado no tratamento de várias patologias infecciosas e mostra-se com alta atividade leishmanicida (KROLEWIECKI et al., 2002; PRATA et al., 2003). Essa droga possui eficácia limitada e uso bastante restrito, porém é utilizada em pacientes nos quais as alternativas para tratamento das leishmanioses não tiveram sucesso e também em pacientes (crianças pequenas, mulheres grávidas e pacientes com doenças graves) com contraindicações para todas as outras drogas (BLUM; HATZ, 2009).

A Pentoxifilina é um fármaco desenvolvido para o tratamento de doença vascular periférica. A droga atua reduzindo a viscosidade sanguínea, melhorando a flexibilidade das hemácias, fluxo microcirculatório e as concentrações presentes de oxigênio no tecido (MICROMEDEX[®], 2015). A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2013) recomendam o uso da Pentoxifilina como coadjuvante no tratamento da leishmaniose, pois apresenta resultados de cura satisfatórios em menor tempo em comparação ao tratamento convencional (AMATO et al., 2007; MACHADO et al., 2007).

Na discussão sobre a atualização das recomendações constantes no Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (BRASIL, 2007), realizada em 2014, em relação à leishmaniose mucosa (LM), foi recomendado o Antimoniato de Meglumina como fármaco de primeira escolha, para pacientes com idade menor que 12 anos. Para pacientes com idade igual ou superior a 12 anos com LM, a recomendação foi à associação do Antimoniato de Meglumina com a Pentoxifilina.

Essa associação terapêutica causa efeitos adversos leves e incluem (artralgias, náuseas, dor abdominal, outros), entretanto, sem maior gravidade clínica (GONZALEZ et al., 2009).

Diversos outros fármacos encontram-se em fase de testes, como a Sitamaquina, a Buparvaquona e o Imiquimod, e apresentaram bons resultados nas fases pré-clínicas (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; ALMEIDA; SANTOS, 2011).

Outros estudos têm direcionado esforços em pesquisas, sobre compostos naturais extraídos de plantas que são eficazes contra diversas espécies do gênero *Leishmania*, dando prioridade aqueles com toxicidade reduzida para hospedeiros humanos (CALDERON et al., 2009; FERREIRA et al., 2011). Meneguetti et al. (2014) relatam em seu estudo que na Amazônia brasileira já foram descritas 27 espécies de plantas com alguma atividade contra *Leishmania amazonensis*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. guyanensis* e *L. major*.

O processo de desenvolvimento de medicamentos é oneroso e requer anos de pesquisa, o que causa um desinteresse da indústria farmacêutica pelas doenças tropicais, já que o público alvo destes produtos não constitui um mercado lucrativo, comprometendo o retorno do investimento (CHATELAIN; IOSET, 2011).

Quanto às despesas com o tratamento para a LTA, especificamente sobre as drogas, a Pentamidina é muito mais dispendiosa, custando quase duas vezes mais do que o antimonial pentavalente. Contudo, o tratamento parenteral prolongado com o antimonial gera despesas indiretas, relacionadas a insumos hospitalares, eventuais necessidades de afastamento do trabalho ou internação (OURIVES-NEVES et al., 2011).

A Rede de Pesquisadores e Colaboradores em Leishmaniose – redeLEISH, apresenta o perfil do produto alvo ideal para o tratamento da LC, através do primeiro Boletim Informativo Anual (2016) – O INFOLEISH, mencionando as seguintes características: que a resposta terapêutica seja independente da espécie, que não haja nenhuma necessidade de monitoramento de segurança, seja bem tolerado, não apresente nenhuma contraindicação e que o uso seja seguro na gravidez e lactação. Quanto a eficácia, 95% dos pacientes devem exibir cura clínica completa em três meses após o início do tratamento, apresentar cicatrização mínima e nenhuma recaída/ forma recidiva. O esquema de administração deverá ser por via oral ou

tópica, com tempo de tratamento em torno de 14 dias (tópica) e menor que 7 dias (oral). Não deve apresentar restrições quanto à idade e abranger pacientes imunocomprometidos. O produto deverá ser estável pelo menos 3 anos a 37°C e sem necessidade de cadeia de frio, e o custo por tratamento deve ser US\$ 5 (DNDI, 2016). Infelizmente, nenhum dos medicamentos até agora utilizados para todas as formas da doença cumprem todos esses critérios.

2.6 Aspectos relativos à Nanotecnologia

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações e avanços nas mais diversas áreas, desde setores de energia, eletrônica, biotecnologia, indústria alimentar até medicina e saúde (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006; ROSSI-BERGMANN, 2008), fornecendo a capacidade de criar produtos mais confiáveis, mais eficientes, mais seguros, e em muitos casos, produtos cuja produção seria impossível de outra forma (CORBETT et al., 2000).

Entretanto, várias são as definições dadas ao termo Nanotecnologia, associando este a Nanociência ou Nanomaterial. Deste modo, a Sociedade Real e a Academia Real de Engenharia Britânicas definiram que a nanotecnologia enfoca no desenho, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas limitando a forma e o tamanho à escala nanométrica (THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

Para um material ser considerado numa escala nanométrica deve ter pelo menos uma das dimensões externas com tamanho igual ou inferior a 100 nanômetros (nm), sendo que 1nm corresponde a 10^{-9} m (FIERASCU; ION; DUMITRIU, 2008).

A figura 09 mostra a escala de dimensões nanométrica, apresentando a escala de comprimento na parte superior variando de 1 m a 10^{-10} m, e ilustra o tamanho de uma bola de futebol em comparação com uma molécula de carbono 60 (C_{60}). A variação de 10^{-7} m (100 nm) a 10^{-9} m (1nm) é expandida na escala na parte inferior da figura.

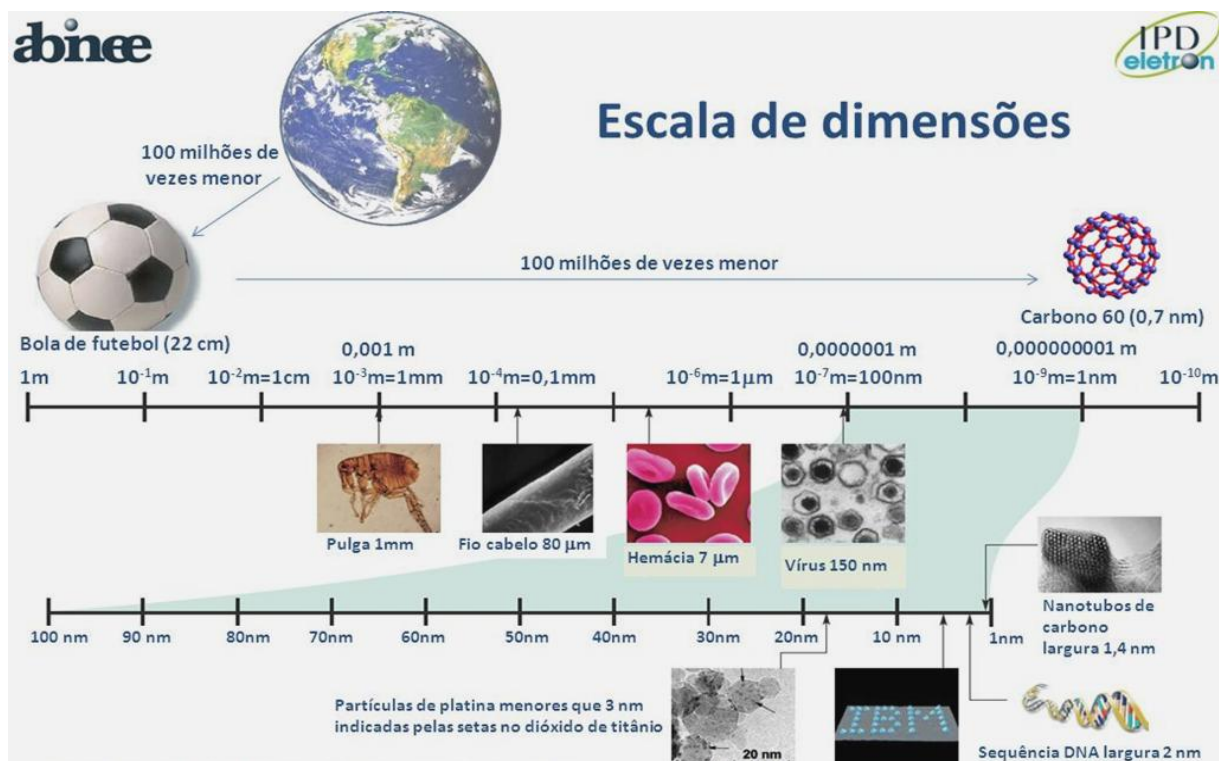


Figura 09- Escala de dimensões nanométrica.

Fonte: The Royal Society e The Royal Academy of Engineering (2004), Nanoscience and Nanotechnologies.

O crescente interesse em torno da nanotecnologia e dos nanomateriais deve-se ao fato destes materiais apresentarem características significativamente diferentes dos materiais numa escala maior, por exemplo, a diminuição do tamanho tem sido associada ao aumento da atividade química do material devido ao aumento da área de superfície específica (THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004). Além disso, o material na escala nanométrica tem que demonstrar propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam aplicação inovadora desse material (FDA, 2014).

Com a aplicação de inovações nanotecnológicas na medicina e saúde, apareceu uma nova área de estudos, a nanomedicina (LOGOTHETIDIS, 2006). As aplicações biomédicas de nanomateriais como biossensores, veículos de fármacos, terapias e agentes antimicrobianos têm sido intensamente exploradas (KUBIK; BOGUNIA-KUBIK; SUGISAKA et al., 2005; MOHANPURIA; RANA; YADAV, 2008).

2.6.1 Nanomateriais

São materiais que possuem graus estruturais da ordem de 1 nm e que tenham propriedades físicas relacionadas a essa baixa dimensionalidade (IJIMA, 1991), ou seja, apresentam propriedades que estão entre os efeitos quânticos dos átomos e as propriedades em volume dos materiais (CONDE, 2005).

Estes são classificados segundo a sua origem em nanomateriais que ocorrem naturalmente, acidentalmente ou como nanomateriais manufaturados; segundo a sua homogeneidade, em termos de composição química ou dimensão, em homogêneos e heterogêneos e quanto à sua natureza ou composição química, podem ser classificados em inorgânicos, orgânicos ou híbridos (COSTA, 2015).

Na categoria dos nanomateriais inorgânicos encontram-se nanopartículas de metais de transição como o ouro (AuNPs) e a prata (AgNPs), que são as nanopartículas mais estudadas e usadas. Os nanomateriais orgânicos incluem os nanomateriais constituídos por átomos de carbono, como os nanodiamantes, nanocones e os nanotubos com uma, duas ou múltiplas camadas de grafeno. Outros de maior interesse na área da medicina são lipossomas, nanomicelas, nanoemulsões e nanopartículas poliméricas (KUAN, 2012; VALCÁRCEL; LÓPEZ-LORENTE, 2014).

Os nanomateriais híbridos caracterizam-se pela utilização de dois tipos de nanocomponentes, formando um único nanossistema. Estes nanomateriais juntam as propriedades dos dois componentes, que podem ser complementares ou que estabelecem efeitos sinérgicos entre si, de forma a obter as características pretendidas (VALCÁRCEL; LÓPEZ-LORENTE, 2014).

Na indústria farmacêutica, com o uso de nanomateriais, desenvolveram-se os fármacos de liberação controlada, frequentemente descritos como "*Drug Delivery Systems*", que oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (PIMENTEL et al., 2007), como a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, promovendo manutenção de níveis plasmáticos em concentração constante, o aumento da eficácia terapêutica; a liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (sensíveis a variação de pH ou de temperatura), a diminuição expressiva da toxicidade pela redução de picos

plasmáticos de concentração máxima, a diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis, a possibilidade de direcionamento a alvos específicos (sítio-especificidade), a possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos dispositivos, a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e aumento da aceitação da terapia pelo paciente (DUNNE et al., 2003).

Nanofármacos permitem interações rápidas com biomoléculas presentes no interior, bem como sobre a superfície da célula (BOGUNIA-KUBIK; SUGISAKA, 2002). A propriedade de fácil acesso para o interior de uma célula e a capacidade resultante de interagir com uma variedade de biomoléculas, tais como, receptores, fatores de transcrição, proteínas de sinalização e ácidos nucleicos, estimula realizações excepcionais no domínio da investigação básica e clínica (BHARDWAJ et al., 2010).

Lipossomas, nanopartículas de metais nobres, nanocristais, nanotubos, nanofibras, nanodiscos, nanoemulsões e conjugações de polímero são alguns tipos de nanoveículos que são atualmente praticados no domínio dos sistemas de administração de fármacos por não só facilitar a entrega direcionada da droga, mas também por aumentar a atividade do medicamento (YARDLEY; CROFT, 1997; DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007; ROMERO; MORILLA, 2008).

Por exemplo, no caso da leishmaniose, formulações de lipossomas antileishmania contendo Anfotericina mostraram uma redução nos níveis de toxicidade quando comparados com a aplicação do fármaco sozinho (EL-TONSY, 2010), pois o parasita reside no interior de macrófagos e a depuração de lipossomas no sistema humano não é um problema. A presença de certos grupos de açúcar, por exemplo, sobre a superfície de lipossomas melhora ainda mais o direcionamento da droga, contido no seu interior, porque contêm receptores de macrófagos na superfície que reconhecem a galactose, a frutose e resíduos de glicose (SHUKLA; PATRA; DUBEY, 2012).

Zanchetta (2009) também desenvolveu um sistema nanoestruturado lipossomal contendo chalcona sintética nitrogenada (CH8) para o tratamento da leishmaniose cutânea, modificando sua superfície pela incorporação do tensoativo PEG: 8L, formando os lipossomas peguilados, mostrando-se um composto químico inovador com propriedades antileishmaniais promissoras.

2.6.1.1 Nanopartículas (NPs)

Vários tipos de nanopartículas têm sido utilizados na medicina, principalmente no diagnóstico e na terapia de doenças, em especial do câncer, como por exemplo, as nanopartículas inorgânicas (nanopartículas de ouro e magnéticas), NPs poliméricas (micelas e quitosana), NPs lipídicas sólidas, lipossomas, nanotubos de carbono, pontos quânticos, assim como os conjugados envolvendo essas NPs (HOLTZ, 2009).

Faraji e Wipf (2009) descrevem os vários tipos de NPs que podem ser empregadas em terapias químicas (Figura 10).

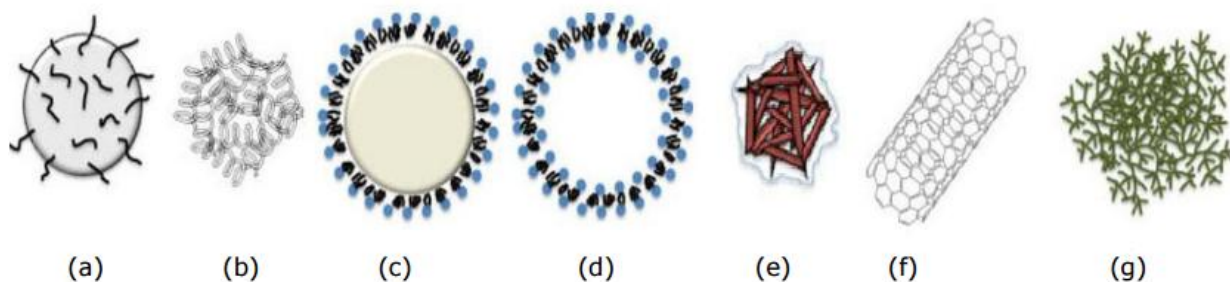


Figura 10- Nanopartículas: (a) NPs inorgânicas; (b) NPs poliméricas; (c) NPs lipídicas sólidas; (d) lipossomas; (e) nanocristais ou pontos quânticos; (f) nanotubos de carbono e (g) dendrímeros. Fonte: FARAJI; WIPF (2009).

Exemplos de NPs na terapêutica de doenças tropicais são descritos por Pimentel et al. (2007), onde diversos nanossistemas já demonstraram eficácia na otimização de vacinas e quimioterápicos destinados ao controle da malária.

Estudos tem mostrado o uso de NPs de metais e semi-metais contra as leishmanioses. Avaliando o comportamento fisiológico de *Leishmania braziliensis*, Barboza-Filho et al. (2012) utilizaram membranas de borracha natural com a incorporação coloidal de NPs de ouro, mostrando um índice mais baixo de promastigotas viáveis.

Uma das principais dificuldades na obtenção de nanopartículas metálicas ou semimetálicas é a obtenção de suspensões coloidais estáveis, já que possuem uma

alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente a imediata agregação destas (KLABUNDE, 2001). Para evitar a agregação das nanopartículas, a preparação de sistemas coloidais geralmente é efetuada em presença de espécies denominadas estabilizadores, que se adsorvem sobre as superfícies das nanopartículas, formando uma camada auto-organizada que impede a coalescência (MELO et al., 2012).

Outros estudos avaliaram NPs de prata (AgNPs), ouro (AuNPs), dióxido de titânio (TiO₂NPs), óxido de zinco (ZnONPs) e óxido de magnésio (MgONPs) em *Leishmania major* e o resultado *in vitro* mostrou atividade tanto à luz UV quanto a IV, aumentando a propriedade leishmanicida das NPs, mas apresentaram alta citotoxicidade em macrófagos, indicando que essas NPs podem ter consequências positivas e negativas no tratamento da LC (JEBALI; KAZEMI, 2013; JEBALI et al., 2014)

Nanopartículas de arsênio (AsNPs) foram produzidas por Chakraborty et al. (2014) e suas propriedades foram testadas contra *Leishmania donovani*, demonstrando ter potencial leishmanicida, pois apresentou inibição do crescimento *in vitro* e da proliferação intramacrofágica.

Quanto ao uso do antimônio pentavalente em sistemas nanoestruturados, há poucos relatos na literatura. Frézard, Demichelli e Ribeiro (2009) descreveram o desenvolvimento de métodos de síntese simples utilizando lipossomas à base de antimoniais pentavalentes e formulações à base de ciclodextrina para promover a distribuição oral de antimônio. O Antimoniato de Meglumina (AM) utilizado como nanomaterial é descrito por Villa (2010) que ao avaliar a eficácia de uma nanoemulsão tópica com AM em úlceras de leishmaniose cutânea em modelo murino, demonstrou um efeito benéfico no controle da parasitose e na cura da lesão, mas sem significância estatística.

Tratamento de infecções crônicas deve, idealmente, ser potente o suficiente para exigir apenas um número limitado ou único de dose, apresentar toxicidade mínima, ser barato e ser fácil de dispensar aos pacientes, e as suspensões nanoparticuladas têm a capacidade inerente para abordar estes requisitos através da melhoria da eficácia dos regimes terapêuticos e, conseqüentemente, da redução dos custos do tratamento. Deve-se considerar ainda, os avanços na imunopatologia, que tem elucidado a função do sistema imune durante a infecção e os sistemas em nanoescala pode ser mais bem projetado para atender aos desafios específicos de

doenças infecciosas no mundo em desenvolvimento (HARTGERS; YAZDANBAKSH, 2006).

Como podemos observar, existe pouca informação sobre a atividade leishmanicida de NPs, logo, o nosso estudo é o primeiro a produzir NPs de antimônio pentavalente para o tratamento pré-clínico da leishmaniose cutânea.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺), *in vitro* e *in vivo*, contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Sintetizar as nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) – (Capítulo I);
- Caracterizar as nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) - (Capítulo II);
- Avaliar o efeito das NPs Sb⁵⁺ contra a forma promastigota de *L. (L.) amazonensis* (Capítulo III);
- Apresentar a citotoxicidade *in vitro* das NPs Sb⁵⁺ e do Glucantime[®] em macrófagos de linhagem murina J774 (Capítulo III);
- Avaliar a atividade *in vitro* das NPs Sb⁵⁺ e do Glucantime[®] em macrófagos de linhagem murina J774 infectados com a forma amastigota de *L. (L.) amazonensis* (Capítulo III);
- Avaliar o tratamento *in vivo* das NPs Sb⁵⁺ utilizando hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. (L.) amazonensis* como modelo experimental (Capítulo IV);
- Avaliar as alterações histopatológicas de fragmentos de tecidos celulares de hamster (*Mesocricetus auratus*) submetido ao tratamento com NPs Sb⁵⁺ (Capítulo IV);
- Investigar as alterações ultraestruturais de fragmentos de tecidos celulares de hamster (*Mesocricetus auratus*) submetido ao tratamento com NPs Sb⁵⁺ (Capítulo IV).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, CoSAS, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, coordenado pela Dra. Antonia Maria Ramos Franco.

- Área de Experimentação Animal, Biotério Central, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, coordenado pelo MSc. Leonardo Brandão Matos.

- Laboratório de Química Inorgânica, Departamento de Química Inorgânica, Universidade de Helsinki/Finlândia, com a colaboração dos professores Dr. Andriy Grafov e Dra. Iryna Grafova.

- Instituto de Química e Tecnologia de Polímeros (ICTP) – CNR/ Conselho Nacional de Pesquisas – Nápoles/Itália, em colaboração com Dr. Maurizio Avella e Dr. Gennaro Gentile.

- Laboratório de Química Analítica Ambiental, Coordenação de Dinâmica Ambiental, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, com a colaboração do Dr. Ézio Sargentini Júnior.

- Laboratório de Histologia Funcional, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, com a colaboração do Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos.

Este tópico foi dividido em várias etapas e está apresentado no fluxograma representado pela figura 11.

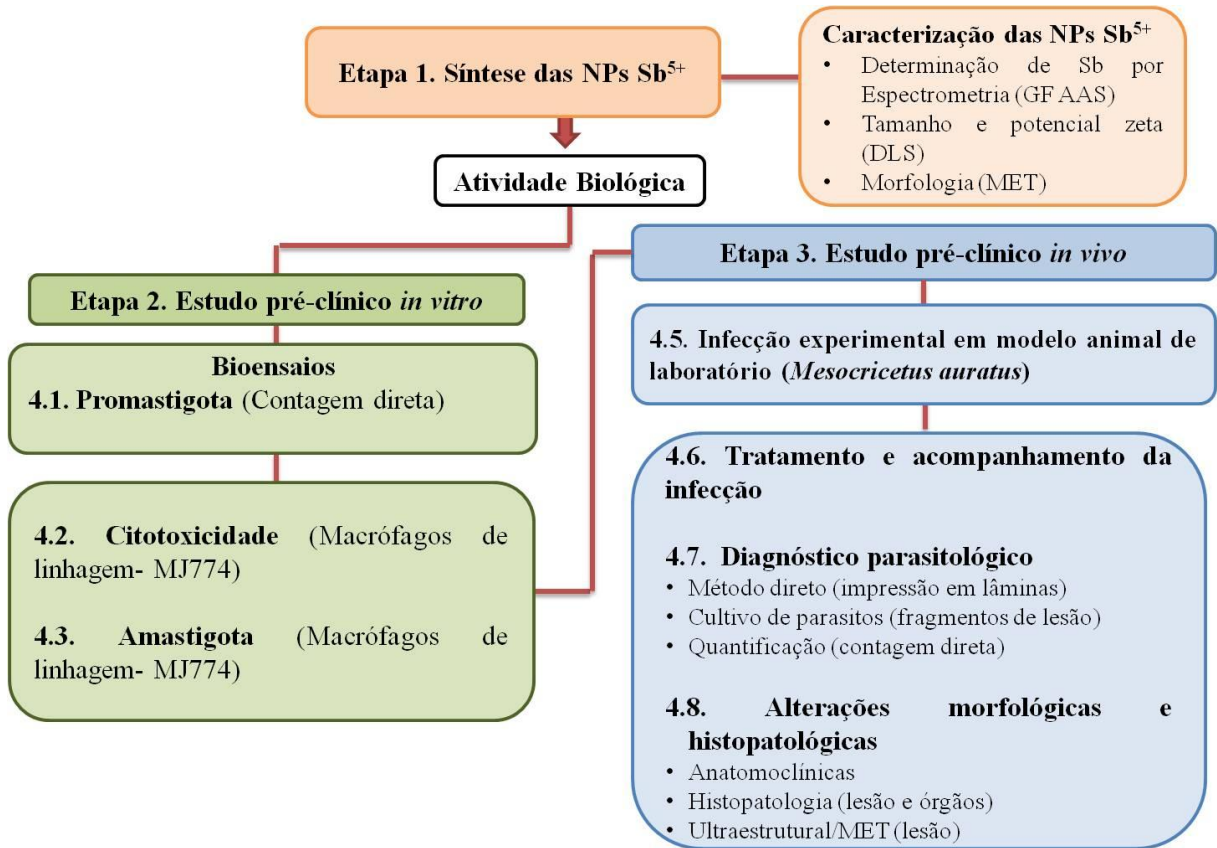


Figura 11- Fluxograma com as etapas metodológicas do estudo.

A seguir serão apresentados os resultados divididos em capítulos de acordo com cada objetivo específico.

CAPÍTULO I

NANOSCALED HYDRATED ANTIMONY (V) OXIDE AS A NEW APPROACH TO FIRST-LINE ANTILEISHMANIAL DRUGS

Franco, A.M.R, Grafova, I., Soares, F.V., Gentile, G., Wyrepkowski, C.D.C., Bolson, M.A., Sargentini Jr., E., Carfagna, C., Leskelä. M., Grafov, A. **International Journal of Nanomedicine**,11, p. 6771–6780, 2016.

Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine
13 December 2016
[Number of times this article has been viewed](#)

Antonia MR Franco¹
Iryna Grafova²
Fabiane V Soares^{1,3}
Gennaro Gentile⁴
Claudia DC Wyrepkowski^{1,3}
Marcos A Bolson⁵
Ézio Sargentini Jr⁵
Cosimo Carfagna⁴
Markku Leskelä²
Andriy Grafov²

¹Laboratory of Leishmaniasis and Chagas Disease, National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil; ²Department of Chemistry, University of Helsinki, Helsinki, Finland; ³Multi-Institutional Post-Graduate Program in Biotechnology, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil; ⁴Institute for Polymers, Composites, and Biomaterials, National Research Council, Pozzuoli, Naples Province, Italy; ⁵Laboratory of Environmental Chemistry, National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil

Background: Coordination compounds of pentavalent antimony have been, and remain, the first-line drugs in leishmaniasis treatment for >70 years. Molecular forms of Sb (V) complexes are commercialized as sodium stibogluconate (Pentostam[®]) and meglumine antimoniate (MA) (Glucantime[®]). Ever-increasing drug resistance in the parasites limits the use of antimonials, due to the low drug concentrations being administered against high parasitic counts. Sb⁵⁺ toxicity provokes severe side effects during treatment. To enhance therapeutic potency and to increase Sb (V) concentration within the target cells, we decided to try a new active substance form, a hydrosol of Sb₂O₅·nH₂O nanoparticles (NPs), instead of molecular drugs.

Methodology/principal findings: Sb₂O₅·nH₂O NPs were synthesized by controlled SbCl₅ hydrolysis in a great excess of water. Sb₂O₅·nH₂O phase formation was confirmed by X-ray diffraction. The surface of Sb (V) NPs was treated with ligands with a high affinity for target cell membrane receptors. The mean particle size determined by dynamic light scattering and transmission electron microscopy was ~35–45 nm. In vitro tests demonstrated a 2.5–3 times higher antiparasitic activity of Sb (V) nanohybrid hydrosols, when compared to MA solution. A similar comparison for in vivo treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with Sb⁵⁺ nanohybrids showed a 1.75–1.85 times more effective decrease in the lesions. Microimages of tissue fragments confirmed the presence of NPs inside the cytoplasm of infected macrophages.

Conclusion/significance: Sb₂O₅·nH₂O hydrosols are proposed as a new form of treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. The NPs penetrate directly into the affected cells, creating a high local concentration of the drug, a precondition to overcoming the parasite resistance to molecular forms of pentavalent antimonials. The nanohybrids are more effective at a lower dose, when compared to MA, the molecular drug. Our data suggest that the new form of treatment has the potential to reduce and simplify the course of cutaneous leishmaniasis treatment. At the same time, Sb₂O₅·nH₂O hydrosols provide an opportunity to avoid toxic antimony (V) spreading throughout the body.

Keywords: nanoparticle, leishmaniasis, hydrated antimony (V) oxide, TEM, transmission electron microscopy

Introduction

Leishmaniasis are a group of diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* transmitted to humans by the bites of infected female phlebotomine sandflies.¹ The World Health Organization (WHO) considers them to be neglected tropical diseases (NTDs). Cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis affect 98 countries, with a prevalence of 12 million cases; 350 million people are at risk of infection.^{2,3} There are no vaccines against these vector-borne diseases, and the clinical outcomes are described as ranging from a simple skin lesion to multi-organ failure, if untreated.⁴ A new global strategy directed at eradication of NTDs by 2020

Correspondence: Andriy Grafov
Department of Chemistry, University of Helsinki, A.I. Virtasen aukio 1, 00014 University of Helsinki, Finland
Tel +358 2 9415 0221
Fax +358 2 9415 0198
Email andriy.grafov@helsinki.fi

relies on a regular supply of quality-assured, cost-effective medicines and support from global partners.⁵ To overcome the global impact of leishmaniasis, the endemic countries need to provide an epidemiological surveillance system and insect vector control in order to reduce disease transmission and to improve earlier diagnosis and treatment.

For >70 years, coordination compounds of pentavalent antimony have been, and are still, the first-line drugs in South America, North Africa, Turkey, Bangladesh, and Nepal for the treatment of all forms of leishmaniasis. Coordination compounds of pentavalent antimony (molecular forms) are commercialized as sodium stibogluconate (Pentostam[®]) and meglumine antimoniate (MA) (Glucantime[®]). MA is one of the main commercial drugs based on pentavalent antimony; the Sb (V) concentration in MA solution is typically 81 mg/mL. The solution is administered as a course or repeated courses of intramuscular injections.

The mechanism of action of antimony is still unclear. Studies suggest that Sb (V) inhibits macromolecular biosynthesis in amastigotes (an intracellular form of the parasite in a vertebrate organism),⁶ possibly altering metabolic processes by inhibiting glycolysis and fatty acid oxidation.⁷ Other studies show that trivalent antimony Sb (III) causes disturbances in the thiol redox potential, which would lead to death of the parasite.⁸ Antimonial treatment of leishmaniasis has been employed for decades, and parasite resistance to such treatment emerged over 20 years ago, first in the region of Bihar in India.⁹ Ever-increasing drug resistance in the parasites limits the prolonged and effective use of antimonials, due to the low drug concentrations being administered in the presence of high parasitic counts. For this reason, the development of new dosage forms for drug delivery to parasite-infected cells is urgently needed. In addition, the toxicity of pentavalent antimony provokes severe side effects during the course of treatment.¹⁰ Therefore, research activities should be focused on the minimization of such effects in the patients.

Recently, it became evident that drug development against leishmaniasis obligates a strengthening of the interaction between researchers developing *in vivo* models and experts in nanomaterials.¹¹ It has been emphasized in the literature that a lack of a multidisciplinary platform hampers the development of nanomedicine products and that development presumes a cross-fertilization at the highest level of knowledge between several different disciplines, including chemistry, nanotechnology, pharmacy, biology, and medicine, as a “must”.^{12–14} However, antileishmanial drugs are first intended for patients from the poorest regions of developing countries. Thus, according to WHO recommendations,

topical therapy of cutaneous and mucocutaneous forms of leishmaniasis will become increasingly important as it is less expensive and simple in application.¹¹

Nanomedicine is an emerging multidisciplinary field that has a huge potential to restore the use of old state-of-the-art toxic drugs by modifying their bio-distribution, improving bioavailability, and reducing toxicity.¹⁵ This valuable tool is able to cross biological barriers and is capable of meeting the challenge of killing the parasite inside the macrophage.¹⁶ Liposomes, polymeric nanoparticles (NPs), metal NPs, and carbon-based materials are described in the literature as nanocarriers.¹¹ In any case, the question is about a specially developed nanocarrier loaded with an active substance in a molecular form. In other words, the influence of both the drug and the nanocarrier must be considered in the evaluation of the impact on the human body. The use of liposomes as carriers for the delivery of antimonials in cutaneous leishmaniasis treatment has been reported.¹⁷ However, liposomes possess several limitations, such as instability that may lead to toxicity due to leakage of the drug into the bloodstream.¹⁸ To the best of our knowledge, no other type of the abovementioned nanocarriers has ever been used for Sb⁵⁺ drug delivery.

In order to enhance the therapeutic potency of the existing drug, an increase of the Sb (V) concentration within the target cells was needed. We decided to try a new form of a known active substance: a hydrosol of Sb⁵⁺ containing NPs instead of the molecular drug form. In this case, we were not dealing with the loading of a medicine on a tailor-made NP, but with the synthesis of the NP, which is a drug itself. We succeeded in synthesizing Sb (V) NPs that were surface treated and stabilized by ligands able to target receptors expressed on the cell membrane. The biological *in vitro* and *in vivo* tests demonstrated a high efficiency of the Sb⁵⁺ nanohybrids against cutaneous leishmaniasis.

Materials and methods

Synthesis of antimony (V) NPs

Ultra-high-purity freshly deionized water was used throughout the experiments. The synthesis was realized by a careful hydrolysis of SbCl₅ in a great molar excess of water, according to a procedure developed by us.¹⁹ The transparent or slightly turbid sols obtained were purified by dialysis until they were essentially chloride free. The dialysis was performed in water, using cellulose membrane tubing (Sigma-Aldrich Co., product no D9777) according to standard procedures. Purified sols were then treated with an aqueous solution of either *N*-methylglucamine (NMGA) or panthenol and left overnight at room temperature under gentle stirring.

Antimony assay

Instrumentation

Antimony determination was performed on an atomic absorption spectrometer, SIMAA 6000 (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA), using electrothermal atomization in a graphite furnace with a THGA tube and a Lumina™ multi-element hollow cathode lamp (both from PerkinElmer). The measurements were performed at the wavelength (λ) 217.6 nm. A slit width of 0.7 nm and a flushing gas flow rate of 250 mL/min were selected, according to the manufacturer's guidelines.

Procedure

All solutions were prepared using high-purity deionized water ($\rho=18.2$ M Ω -cm, Purelab Ultra, ELGA). Nitric acid (65% Suprapur®; Merck) was used for the preparation of all acidic solutions. Analytical calibration solutions containing 10, 20, 40, and 100 $\mu\text{g/L}$ of Sb were prepared by serial dilutions of the analytical standard solution for atomic absorption, Titrisol® (Merck), containing 1,000 $\mu\text{g/L}$ of Sb in 0.1% v/v HNO₃. The sample solutions were diluted 20,000–40,000 times with 1% v/v HNO₃.

A quantity of 20 μL of solution was injected into the furnace for analysis, both for the calibration and for the sample solutions; 5 μL of Pd(NO₃)₂ and Mg(NO₃)₂ solutions containing 5 and 3 μg of M²⁺, respectively, were added as chemical modifiers. The same procedure was used for the calibration solutions as well. The heating program of the furnace developed for Sb analysis in serum and urine was optimized as shown in Table 1.

NP characterization

Dynamic light scattering (DLS)

Particle size and ζ -potential measurements were performed with a Zetasizer Nano (Malvern Instruments) using the original Sb⁵⁺ hydrosols in appropriate polystyrene cuvettes.

Transmission electron microscopy (TEM)

TEM micrographs were obtained with a FEI Tecnai G12 Spirit-Twin transmission electron microscope with a LaB₆

source and operating with an acceleration voltage of 120 kV, equipped with a bottom-mounted FEI Eagle-4k CCD camera (Eindhoven, the Netherlands).

X-ray diffraction (XRD)

The XRD patterns were recorded on an X'Pert PRO MPD instrument (PANalytical B.V., the Netherlands) operating at 40 kV, 40 mA, using Cu-K α radiation ($\lambda=0.15418$ nm), equipped with a built-in goniometer, an automatic divergence slit, and a PIXcel detector unit. Diffractograms were collected from $2\theta=4$ to 70° , using steps of 0.02° .

Parasite culture

The promastigote culture of a Brazilian *Leishmania* strain (*Leishmania (Leishmania) amazonensis*) was obtained from the collection of the Leishmaniasis and Chagas Disease Laboratory, National Institute of Amazonian Research (INPA; MHOM/09/BR/IM5584). The strain was maintained in an NNN- (Novy, MacNeal, and Nicolle) modified blood agar base (BD Biosciences, USA) supplemented with Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Sigma, USA, R-7388), with 20 mM HEPES and L-glutamine without NaHCO₃ at 25°C. *Leishmania* promastigotes were cultured in a sterile 25 cm² tissue culture flask containing RPMI-1640 medium supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (iFBS) (Biobras, Brazil) at pH =7.2 and at a temperature of 25°C. The parasites were centrifuged at 4,000 rpm for 10 min, diluted with sterile RPMI-1640, and counted using a Neubauer chamber viewed under an optical microscope. Then, the parasites were diluted with fresh complete medium to a concentration of 2×10^6 cells/mL.

Leishmanicidal activity in vitro

Promastigotes of *L. amazonensis* were cultivated and amplified in a modified NNN biphasic medium using sterile phosphate-buffered saline (PBS). Parasites at the end of log phase (beginning of the stationary phase) were centrifuged at 4,500 rpm for 10 min, washed three times with PBS, and centrifuged at the same speed for 10 min. The parasite suspension was diluted with fresh culture medium to a final concentration of 2×10^6 cells/mL.

The tests were performed in a sterile transparent polystyrene 96-well cell culture plate using a maximum volume of 200 μL of the test solution per well. A volume of 100 μL of culture medium and 100 μL of the Sb (V) NP hydrosol were added in wells of the first column (except for the last two rows), and serial 1:2 v/v dilution of that

Table 1 Heating program for the Sb assay using electrothermal atomic absorption spectrometry with Pd²⁺ and Mg²⁺ as modifiers

Stage	Temperature (°C)	Ramp time (s)	Holding time (s)	Ar flow rate (mL/min)
1	110	1	30	250
2	130	15	30	250
3	1,300	10	20	250
4	2,300	0	5	0
5	2,500	1	3	250

mixture with the culture medium was carried out into the subsequent columns.

Two hydrosol samples, VRSb₁ and VRSb₂, were used in the in vitro experiments. Both contained the NMGA ligand, but the VRSb₂ was less concentrated for Sb⁵⁺. Thus, Sb⁵⁺ concentrations ranging from 4.21 to 0.27 mg/mL and from 1.77 to 0.11 mg/mL were obtained for VRSb₁ and VRSb₂ samples, respectively. Subsequently, 100 µL of cultured parasite suspension (2×10⁶ cells/mL) was added to each well of the plate. The plate was incubated at 25°C for 48 h, and the number of viable parasite cells in each well was determined microscopically by Trypan blue (Sigma) dye exclusion test in a Neubauer hemocytometric chamber. The last two rows were left for negative control (NC) and positive control. One NC received the culture medium with ligands and the other one the medium only, while the positive control contained serial dilutions of the commercial antileishmanial drug MA solution. All experiments were performed in triplicate.

Antileishmanial efficacy calculation

The percentage efficacy (%E) was calculated using the formula

$$\%E = \frac{\bar{x}_{NCG} - \bar{x}_{TG}}{\bar{x}_{NCG}} \times 100\%,$$

where \bar{x}_{NCG} and \bar{x}_{TG} are arithmetic means of the number of viable parasites in the NC group and the treated group, respectively.²⁰

Leishmanicidal activity in vivo

Adult male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) were selected as a biological model and maintained under pathogen-free conditions in the Bioterium (Laboratory Animal Facility) of the INPA (National Institute of Amazonian Research). They were inoculated into the snout with 10⁶ cells/mL of the stationary-phase promastigote form of *L. amazonensis* parasite.

Three groups of five experimental animals each received a treatment of the Sb-NP formulas (VVSb₁ and VVSb₂) or of commercial MA (4.4 mg/kg/day of MA; Aventis, Brazil). The fourth, NC, group did not receive any chemotherapy. The MA was administered by the intramuscular route; other treatments were applied intralesionally once daily with the same amount of 0.4 mL (for VVSb₁ [Sb⁵⁺]=4.09 mg/mL/day, for VVSb₂ [Sb⁵⁺]=0.65 mg/mL/day). The VVSb₁ sample contained the Sb⁵⁺ NPs treated with NMGA ligand, and the VVSb₂ was treated with panthenol. The total lesion size was derived from the mean lesion length, width, and height

measured and recorded daily with a digital Vernier caliper (Precision Zaas/Amatools).

The treatment lasted for 26 days (20 follow-up days with 3 weekly intervals of 2 days). Subsequently, the animals were euthanized and necropsy was performed. Fragments of the lesion tissues were inoculated in NNN biphasic culture medium and complete RPMI-1640 cell culture medium (Sigma) supplemented with 10% of iFBS to determine the parasite viability.

Tissue sample preparation for TEM investigation

Fragments of the lesion tissues were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 0.1 M cacodylate buffer and dehydrated through a series of treatments in solutions at increasing acetone concentrations (10, 30, 60, 90, and 100% by volume). Each treatment lasted for 15 min, and the last 100% acetone treatment was repeated three times. Dehydrated samples were embedded into epoxy resin 45359 (Epoxy-Embedding Kit; Fluka) according to standard protocols. The impregnation process was performed in three steps. First, the samples were treated with acetone/epoxy mixture (1:1 v/v) for 30 min, then with acetone/epoxy mixture (1:2 v/v) for a further 30 min. Subsequently, the samples were immersed in a final epoxy mixture and transferred to a silicone rubber mold. Polymerization of the epoxy resin was performed at 45°C for 48 h. The embedded samples were then ultrasectioned at room temperature on a Leica EM UC6/FC6 ultramicrotome at a speed of 1–2 mm/s. Ultrathin sections with a thickness of 80–90 nm were produced, collected, and mounted on 400-mesh copper grids.

Ethical approval

All experiments were performed strictly following the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (COBEA). The ethical permission protocols were approved by the Animal Ethics Committee of the National Institute for Amazonian Research (CEUA/INPA, no 011/2012 and no 009/2015).

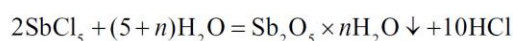
Results and discussion

The original idea in this study was to obtain stable active NPs directly in a hydrosol form. We supposed that the nano-sized particles would penetrate directly into affected cells, creating a high local concentration of the drug. In this way, a stronger therapeutic effect could be achieved. At the same time, undesirable spreading of active substance throughout

the body could be avoided, thus reducing significantly several undesirable side effects.

The most suitable compound for forming Sb^{5+} -containing sols in water was the hydrated antimony (V) oxide, $\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, also called polyantimonic acid. This material was obtained previously in a solid form for proton conducting and electrochromic applications.^{21–25} All the cited papers deal with the solid material obtained by precipitation, consequent drying, and thermal treatment; thus, the particles involved were forced to aggregate and crystallize.

Our principal objective was to obtain a stable $\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ hydrosol instead of a crystalline precipitate. For that purpose, the reaction was carried out at a high molar excess of water (1,000–2,500 mol H_2O :1 mol Sb) by slow dropwise addition of SbCl_5 at room temperature and effective stirring.¹⁹



Use of the high excess of water prevented both heating of the reaction mixture due to the exothermic hydrolysis reaction and formation of a crystalline precipitate. The transparent or slightly turbid sols obtained were purified by dialysis from the HCl formed in the reaction. Purified sols

were then treated with an aqueous solution of either NMGA or panthenol and left overnight at room temperature under gentle stirring. The NMGA was chosen by analogy with the commercial drug MA, a solution of the Sb (V) coordination compound containing NMGA ligands.²⁶ 2,4-Dihydroxy-*N*-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimethylbutanamide or panthenol (B5 provitamin) was used as another nitrogen-containing ligand. It is an effective skin penetration-enhancing agent that reduces skin inflammation and accelerates the healing rate of wounds.²⁷ Those ligands were chosen to stabilize the $\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ NPs and to facilitate the drug uptake to cells by endocytosis. Finally, the hydrosols were allowed to evaporate in order to achieve Sb concentrations comparable with the Sb^{5+} content in MA diluted for use in experimental animals (20.25 mg/mL).

$\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ NP sol possessed a very high stability, and it did not decompose or undergo modifications during storage under ambient conditions for >1 year. The mean particle size and ζ -potential were measured by DLS (Figure 1A and B) using the original Sb^{5+} hydrosols in appropriate polystyrene cuvettes. The NP size was also confirmed by TEM (Figure 1C). A part of the sol was allowed to dry, and X-ray diffractograms of the powder obtained were recorded. The diffraction pattern

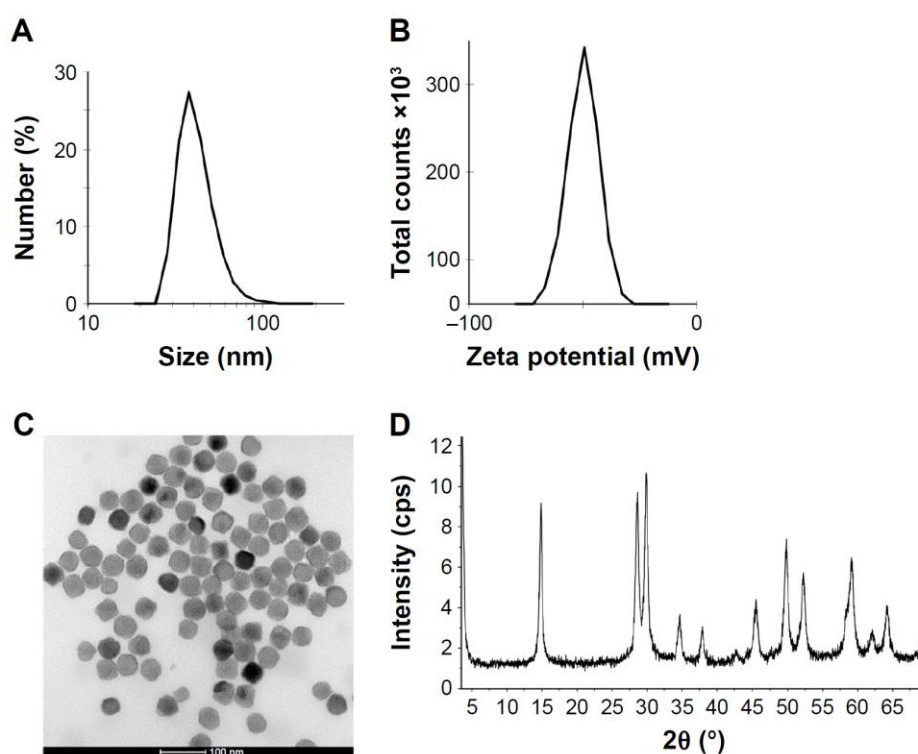


Figure 1 Characterization of NPs: particle size distribution (A) and ζ -potential (B) measured by DLS; TEM micrograph of the NPs (C); XRD pattern of a precipitate after drying of the hydrosol (D).

Abbreviations: NPs, nanoparticles; DLS, dynamic light scattering; TEM, transmission electron microscopy; XRD, X-ray diffraction.

of the material (Figure 1D) corresponded to that of hydrated antimony (V) oxide, $\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.²⁴

The distribution of particle size was quite narrow, and the maximum indicated a mean NP size of ~42 nm (Figure 1A). The magnitude of ζ -potential, -49.8 mV (Figure 1B), gives evidence of a very high stability of the sol due to effective electrostatic repulsion of the adjacent particles, which prevents their aggregation. The negative value of the ζ -potential reveals the anionic character of the NPs, intrinsic to the polyantimonic acid particles. A multitude of uniform nano-sized particles is clearly visible on the TEM micrograph (Figure 1C). The NPs had a regular shape and size of ~35–45 nm. The particle size and its distribution measured by DLS were in a good agreement with the TEM data.

The use of a nanoparticulated active ingredient in a hydrosol enables topical or intralesional drug administration. Such administration routes play an important role in dermatologic therapy, since they permit direct delivery of medication into skin lesions, the areas where the parasites are mostly concentrated. Such therapy could be particularly prominent for the treatment of the cutaneous form of leishmaniasis. In this way, the drug delivered into the dermis acts over a period of time, resulting in prolonged therapy. Simultaneously, the adverse effects of systemic therapy would be avoided or minimized.

The nanoparticulated hydrated antimony (V) oxide sols (samples VRSb₁ and VRSb₂) were, for the first time, tested in vitro in order to evaluate their antileishmanial activity against promastigote forms of the pathogenic protozoa *L. amazonensis*. Antimony concentrations in the hydrosols, determined by atomic absorption spectrometry, were as follows: [Sb] = 16.87 mg/mL for VRSb₁ and [Sb] = 7.10 mg/mL for VRSb₂. Stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* (10⁶ cells/mL) were cultured at 25°C in RPMI-1640 medium supplemented with 10% iFBS and used for the experiments.

The antiparasitic activity was evaluated by viable cell counting after 24 and 48 h of the promastigotes being exposed to the test solutions versus positive control and NC ones. All the bioassays were done with serial dilutions (1:4 to 1:64) of substances, and each one was carried out in triplicate. The Sb⁵⁺ hydrosol to cell culture medium ratio (v/v) was 1:3 throughout all experiments. Thus, the maximum concentration of the VRSb₁ sample was 16.87:4=4.22 mg/mL. MA solution containing 20.25 mg/mL of Sb⁵⁺ was used as a positive control; this refers only to the presence of parasites in the same axenic culture medium at the experimental conditions used. An initial inoculum of the flagellates, 10⁶ cells/mL, in axenic culture medium was used as an NC. Cells continued to grow, giving rise to a mean value of 1.7×10⁶ cells/mL after 24 h and 2.9×10⁶ cells/mL after 48 h. The experimental results are shown in Figure 2.

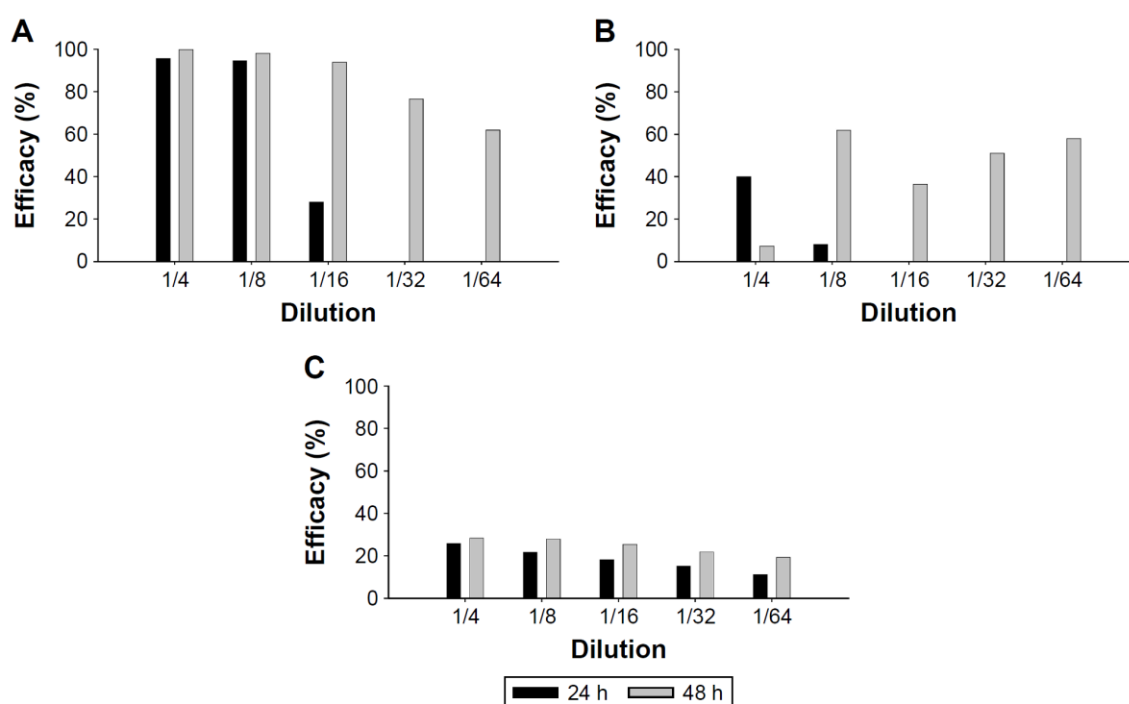


Figure 2 Percentage antileishmanial efficacy in vitro of $\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ nano-hybrids with NMGA, compared to MA at different dilutions after exposure for 24 and 48 h.

Notes: The graphs correspond to VRSb₁ (A), Sb⁵⁺ concentrations 4.22, 2.11, 1.05, 0.53, and 0.26 mg/mL; VRSb₂ (B), Sb⁵⁺ concentrations 1.78, 0.89, 0.44, 0.22, and 0.11 mg/mL; MA (C) Sb⁵⁺ concentrations 5.06, 2.53, 1.26, 0.63, and 0.32 mg/mL.

Abbreviations: NMGA, N-methylglucamine; MA, meglumine antimoniante.

As illustrated by the graph for the VRSb₁ sample (Figure 2A), ~100% efficacy was observed both after 24 h and after 48 h of the parasites being exposed to the hydrosols at Sb⁵⁺ concentrations of 4.22 and 2.11 mg/mL. After 48 h of exposure, the efficacy remained practically at the same level even for the second dilution (1:16) and slightly decreased at the subsequent dilutions. However, no visible activity was observed for the dilutions starting from 1:32 after 24 h of the experiment. The half maximal effective concentration (EC₅₀) values for VRSb₁ were found to be 1.35 mg/mL after 24 h of exposure and <0.26 mg/mL after 48 h. As can be seen from the graphs (Figure 2A and B), the efficacy after 24 h of exposure was registered only at higher concentrations for both NP hydrosol samples. VRSb₂ showed a weak inhibition effect after 24 h, and no visible activity was found for dilutions higher than 1:16. After 48 h, the EC₅₀ was observed at 0.11 mg/mL, when compared with a mean number of viable parasites found in the NC. We would like to draw particular attention to the fact that both nanohybrid hydrosols revealed higher antiparasitic activity in vitro, when compared to the MA solution (positive control). The graph (Figure 2C) demonstrates that the EC₅₀ level was never reached in the MA experiments.

Thus, the in vitro tests convincingly showed that the antiparasitic activity of Sb⁵⁺ nanohybrids is considerably higher (2.5–3 times) when compared to the commercial molecular form of the pentavalent antimonial drug. The maximum efficacy was observed after 48 h for VRSb₁ hydrosol, which was more concentrated for Sb (V) (Figure 2A).

The therapeutic action of the Sb₂O₅·nH₂O nanohybrid solutions was studied in vivo in an animal model on experimental cutaneous leishmaniasis caused by the *L. amazonensis* parasite. Experiments were carried out on groups of adult male Syrian hamsters selected as the biological model and followed up by measurements of the skin lesion size, its evolution, and development in response to the treatment.

Each group of laboratory animals received one of the following treatments: Sb₂O₅·nH₂O nanohybrids surface treated with NMGA ligand (VVSb₁); Sb₂O₅·nH₂O nanohybrids surface treated with panthenol ligand (VVSb₂); and commercial MA solution. The MA was administered by the intramuscular route, whereas the other treatments were applied intralesionally once daily. The NC group did not receive any chemotherapy.

The results of the in vivo experiments are shown in Figure 3A as plots of mean lesion size for each day of treatment and lesion evolution trend lines. As illustrated by the graph, a more visible reduction of skin lesion size was observed in groups treated with VVSb₁ and VVSb₂

nanohybrids. Both the NC group and the group receiving molecular drug treatment (MA) exhibited higher lesion sizes with a tendency to grow. The latter became particularly evident during the second half of the treatment. During the first half of the treatment, the best size reduction tendency of the lesions provoked by *L. amazonensis* was observed for VVSb₁ nanohybrid hydrosol containing NMGA ligand (Figure 3A). In the second half of the treatment, the therapeutic efficiency of the panthenol-containing hydrosol VVSb₂ reached the same level as for VVSb₁ or even higher. This fact may be attributed to the known skin penetration enhancement property of the panthenol ligand.²⁸

At the end of the treatment, the biggest mean lesion size was observed in the NC group. It was 1.31 times bigger than the mean lesion size in the group treated with the molecular drug (MA group) and 2.3–2.45 times bigger than those observed in both nanohybrid treatment-receiving groups (VVSb₁ and VVSb₂). The results of our in vivo experiments convincingly show the advantage of Sb₂O₅·nH₂O nanohybrid treatment over the MA one: the nanoformulas were 1.75–1.85 times more efficient.

The abovementioned tendencies were also clearly confirmed by photographs (Figure 4) showing the lesion behavior on the snouts of hamsters experimentally infected with *L. amazonensis*. The images demonstrate the response to the treatment with VVSb₁ and VVSb₂ nanohybrids compared to that with the molecular antimonial drug (MA) and in an absence of treatment (NC). No clinical signs of toxicity were observed in animals receiving the treatments. The hamsters were of healthy appearance and retained mobility and vitality. Furthermore, the percentage of mortality was zero during the 26 days of treatment. At the very beginning of treatment, all animals presented nodular lesions of bulky appearance and uniform diameter. Differences began to appear throughout the experiment. The NC group had ulcerations without defined borders, intense edema, erythema, and crust appearance. The MA-treated group demonstrated a slight diminution of the skin lesion area, persistent ulceration, and crust emergence on the lesion border, whereas the groups of animals treated with both VVSb₁ and VVSb₂ NPs revealed a significant decrease of injury, a mild erythema, and/or skin scales.

In addition to lesion size measurements, tissue fragments from the lesion area were collected for TEM investigation and for detection of the occurrence of NPs inside the cells. TEM images clearly showed the microstructural features of the sequential tissue response after inoculation with *L. amazonensis* and treatment. Intracellular amastigote forms of the parasite were found at the inoculation site of the NC group. The presence of nanohybrids inside the

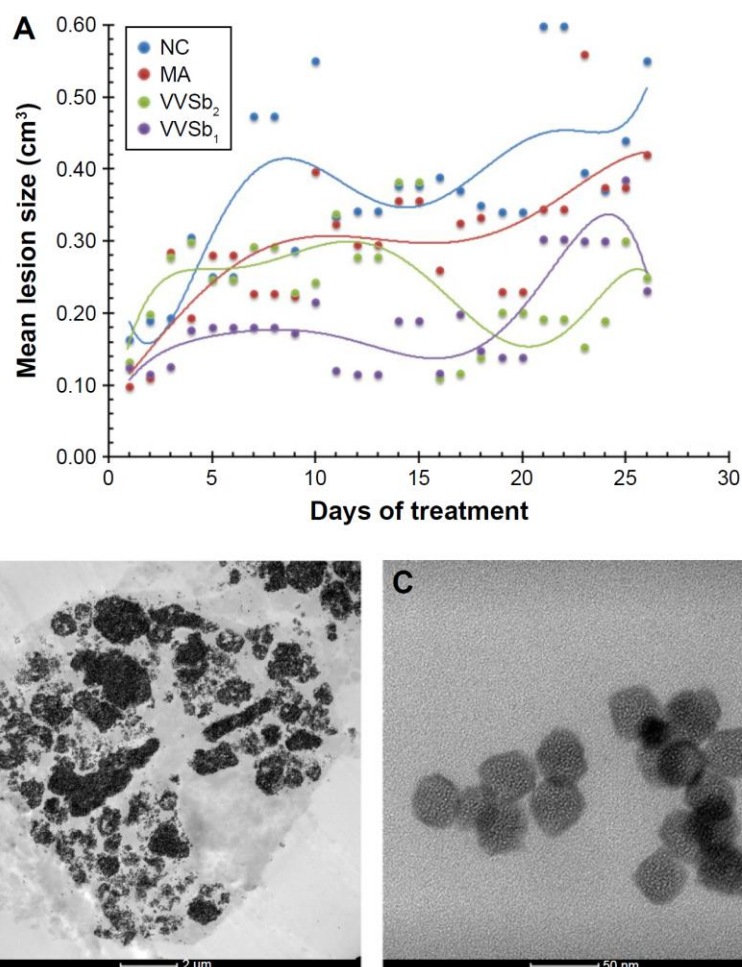


Figure 3 Scatter plots and trend lines of mean lesion size monitored in experimental animals infected with *Leishmania amazonensis* (A); TEM micrographs showing the presence of $\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ NPs in the cytoplasm of a phagocyte of an animal treated with VVSb₁ (B); and those NPs visualized at a higher magnification (C).
Abbreviations: TEM, transmission electron microscopy; NPs, nanoparticles; NC, negative control; MA, meglumine antimoniate.

cytoplasm of the infected macrophages was observed for all the animals that had received treatment with VVSb₁ or VVSb₂ (Figure 3B and C). The amount of NPs in the tissue was dependent on the total dose of Sb^{5+} received during the treatment. An interesting tendency was observed for each hydrosol sample: the quantity of NPs inside the cytoplasm of infected macrophages decreased for the tissue samples extracted after 26 days of treatment with respect to those extracted after 15 days. Hence, the nanoparticulated drug was being metabolized. The abovementioned assumption was also supported by TEM. NPs of a mean size of 49.3–48.4 nm were found in the snout tissue cells from infected hamsters biopsied after 15 days of treatment, whereas those after 26 days were smaller in size (45.5–44.5 nm). It should also be noted that no amastigotes were found within the macrophages of treated animals, despite their positive re-isolation in the cell culture medium.

Conclusion

Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide hydrosols are proposed as a new effective dosage form for topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. The nanohybrids obtained differ from any previously made nano-sized drug forms, such as liposomes or nanocapsules containing the molecular form of the drug as a payload inside a nanoscaled vehicle. The novelty of the proposed approach consists of the fact that $\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ NPs are drugs themselves; they are nanomatrices made of the active compound (Sb^{5+}), which may bear different targeting ligands as a nanohybrid component.

The high stability of the $\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ hydrosols was established by ζ -potential measurements. The uniformity of the particles, as well as their size, was determined by DLS and TEM studies. In order to facilitate the receptor-mediated endocytosis of $\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ NPs, targeting ligands NMGA and

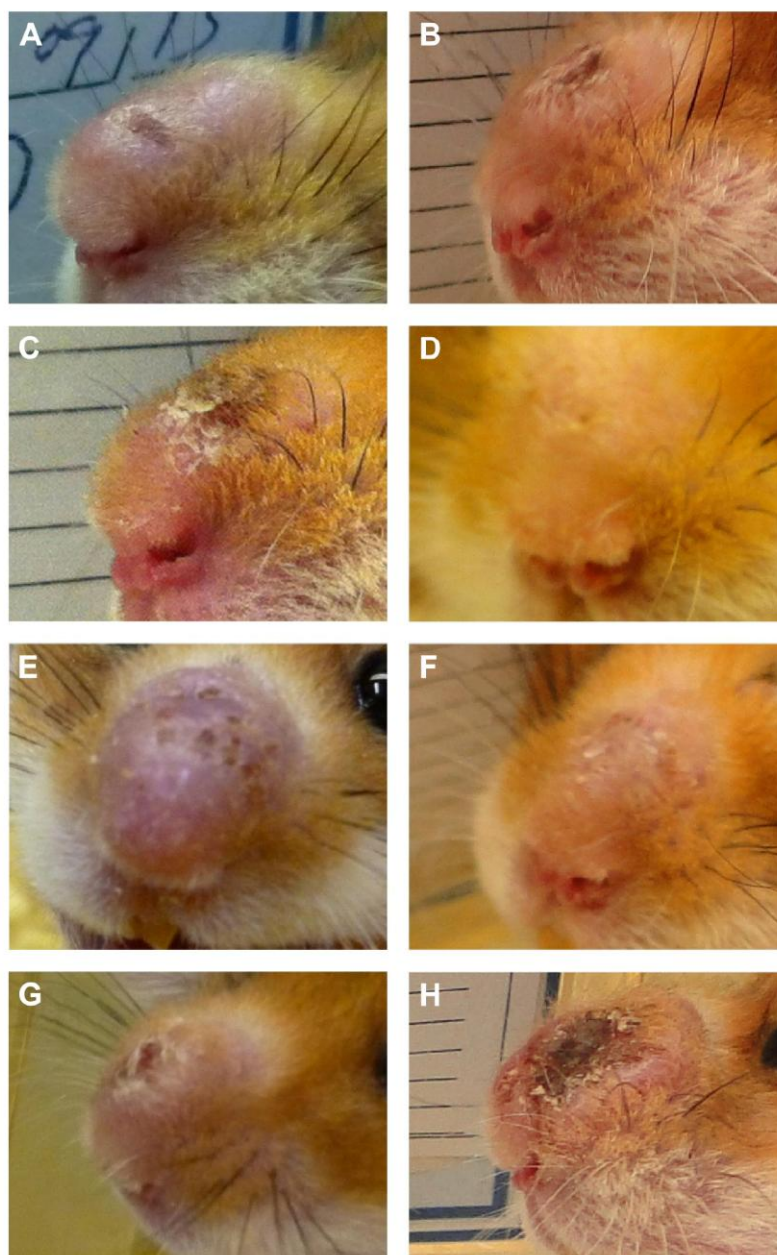


Figure 4 Clinical evolution of lesions on the snouts of hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania amazonensis* and monitored for 26 days. **Notes:** MA-treated animals on the 5th (A) and 26th (B) days; VVSb₁-treated animals on the 5th (C) and 26th (D) days; VVSb₂-treated animals on the 5th (E) and 26th (F) days; untreated NC group animals on the 5th (G) and 26th (H) days. **Abbreviations:** MA, meglumine antimoniate; NC, negative control.

panthenol were used for their surface treatment. In vitro tests were performed on promastigote forms of *L. amazonensis*. Sb (V) nanohybrids demonstrated 2.5–3 times higher antiparasitic activity, when compared to MA, a molecular drug form. Our in vivo data on the treatment of skin lesions provoked by experimental cutaneous leishmaniasis in hamsters (*M. auratus*) showed a 1.75–1.85 times higher efficacy of the nanohybrids with respect to MA. TEM images of tissue fragments confirmed the uptake of the pentavalent antimony NPs directly into the

affected cells, creating a high local concentration of the drug. The latter fact is a precondition to overcoming the resistance of the parasites to the molecular form of the medicine.

Furthermore, the nanohybrids were more effective at a lower administered dose when compared to the commercial first-choice molecular drug MA. The toxicological profile of the nanohybrids and new topical administration routes, as well as other Sb₂O₅·nH₂O containing nanohybrid formulas, are now under development.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support of the presented research by the University of Helsinki and the Magnus Ehrnrooth Foundation, Finland; the Centre of Excellence on Atomic Layer Deposition of the Academy of Finland; the European Union (EU) international staff exchange project FP7-PEOPLE-IRSES-2011-295262, (VAIKUTUS); the National Institute of Amazonian Research (INPA), and the Ministry of Scientific and Technological Development (MCTI), Brazil. The authors would like to thank Dr TT Espir for her advice and help in performing in vitro tests, Dr FG Pinheiro for her helpful assistance during the experiments at the Bioterium of the INPA, and Ms MC del Barone for TEM sample preparation.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- World Health Organization [webpage on the Internet]. Leishmaniasis. Fact sheet; 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Accessed October 11, 2016.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 2009;14(7):2317–2336.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671. [Kirk M, editor].
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("spundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;80(6):859–876.
- World Health Organization. *Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases – A Roadmap for Implementation*. Geneva: WHO Press; 2012. Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/2012/WHO_HTM_NTD_2012.1_eng.pdf. Accessed October 11, 2016.
- Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;27(6):916–920.
- Berman JD, Hanson WL, Lovelace JK, et al. Activity of purine analogs against *Leishmania donovani* in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(1):111–113.
- Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2004;279(38):39925–39932.
- Jeddi F, Piarroux R, Mary C. Antimony resistance in leishmania, focusing on experimental research. *J Trop Med*. 2011;2011:1–15.
- Marsden PD. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1985;18(3):187–198.
- Gutiérrez V, Seabra AB, Reguera RM, Khandare J, Calderón M. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. *Chem Soc Rev*. 2016;45(1):152–168.
- Prasad PN. *Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc; 2012.
- Kaur IP, Kakkar V, Deol PK, Yadav M, Singh M, Sharma I. Issues and concerns in nanotech product development and its commercialization. *J Control Release*. 2014;193:51–62.
- CLINAM. *The European Summit for Clinical Nanomedicine and Targeted Medicine. The Translation to Knowledge Based Medicine*. Available from: <https://clinam.org/images/stories/pdf/conference2015.pdf>. Accessed October 11, 2016.
- Tripathy S, Roy S. A review of age-old antimalarial drug to combat malaria: efficacy up-gradation by nanotechnology based drug delivery. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(9):673–679.
- Prabhu P, Patravale V, Joshi M. Nanocarriers for effective topical delivery of anti-infectives. *Curr Nanosci*. 2012;8(4):491–503.
- Moosavian Kalat SA, Khamesipour A, Bavarsad N, et al. Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of *L. major* lesion in BALB/c mice. *Exp Parasitol*. 2014;143(1):5–10.
- Pham TTH, Loiseau PM, Barratt G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *Int J Pharm*. 2013;454(1):539–552.
- Grafov A, Grafova I, Franco AMR, Leskelä M. Leishmanicidal inorgano-organic nanohybrids, synthesis and application of the same. Patent BR 10 2013 029618 0.
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, et al. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol*. 1992;44(1–2):35–44.
- Abe M, Ito T. Synthetic inorganic ion-exchange materials. X. Preparation and properties of so-called antimonic(V) acid. *Bull Chem Soc Jpn*. 1968;41(2):333–342.
- Bajārs G, Lagzdons J, Petrovskis G. Solid proton electrolytes in electrochromic systems. In: Lūsis A, editor. *Elektrohromizm*. Riga: Latvian State University; 1987:51–66.
- Novikov BG, Materova EA, Belinskaya FA. On the nature and stability of precipitated polyantimonic acids. *Russ J Inorg Chem*. 1975;20(6):1566–1572.
- Dzimitrowicz DJ, Goodenough JB, Wiseman PJ. A.C. proton conduction in hydrous oxides. *Mater Res Bull*. 1982;17(8):971–979.
- Vaivars GJ, Kleperis JJ, Lūsis AR. Study on antimonic acid hydrates obtained by sol method. *Russ J Electrochem*. 1992;28(10):1438–1443.
- Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimoniate (glucantime). *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(5):1076–1082.
- Ebner F, Heller A, Rippke F, Tausch I. Topical use of dexpantenol in skin disorders. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3(6):427–433.
- Bissett DL, Oblong JE, Goodman LJ. Topical vitamins. In: Draeos ZD, editor. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. 2nd ed. Wiley-Blackwell; 2015:336–345.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBASE, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

CAPÍTULO II

ESTABILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ANTIMÔNIO PENTAVALENTE (NPs Sb⁵⁺) COM PROPRIEDADES PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

CAPÍTULO II

ESTABILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ANTIMÔNIO PENTAVALENTE (NPs Sb⁵⁺) COM PROPRIEDADES PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Fabiane Veloso Soares^{1,2}, Pedro Rael Cândido Domingos^{1,2}, Andriy Grafov³, Iryna Grafova³, Ézio Sargentini Jr⁴, Marcos A. Bolson⁴, Gennaro Gentile⁵, Antonia Maria Ramos Franco²

¹Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, Am, Brasil.

²Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Pesquisas em Ambiente, Saúde e Sociedade (CoSAS), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, Am, Brasil.

³Laboratório de Química Inorgânica, Departamento de Química, Universidade de Helsinki. Helsinki, Finlândia.

⁴Laboratório de Química Analítica Ambiental, Coordenação de Dinâmica Ambiental, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, Am, Brasil.

⁵Instituto de Química e Tecnologia de Polímeros (ICTP) – CNR/ Conselho Nacional de Pesquisas, Nápoles, Itália.

RESUMO

O presente trabalho descreve a caracterização de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) estabilizadas com os ligantes orgânicos N-metil-D-glucosamina (NMGA) e D-pantenol (DP). Para alcançar os objetivos, a estabilidade das NPs Sb⁵⁺ foi estudada através de medidas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) obtendo valores absolutos em torno de -49,8 mV. Essas mesmas medidas também forneceram o tamanho das NPs Sb⁵⁺ que exibiram tamanho médio de 42 nanômetros. As NPs Sb⁵⁺ foram visualizadas por imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) apresentando formato esférico, dispersas e com superfície lisa. As concentrações de antimônio pentavalente foram confirmadas através da Instrumentação por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS), sendo a suspensão ETSbL2 a menos concentrada com 1,62 mg/Sb⁵⁺/mL e ETSbL1[b] a mais concentrada com 10,21 mg/Sb⁵⁺/mL. Os resultados obtidos demonstram um sistema nanoestruturado estável que favorece a veiculação direcionada das NPs, com potencial para futuras aplicações *in vitro* e *in vivo* no tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Leishmaniose. Antimonio pentavalente. Nanopartículas.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (COPELAND; ARONSON, 2015), existindo insuficientes pesquisas relacionadas a novos fármacos, havendo escasso interesse comercial por parte da indústria farmacêutica, o que pouco tem contribuído no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento dessa doença (CAPPELARO, 2012; WHO, 2014).

O arsenal terapêutico da leishmaniose é bem limitado e altamente tóxico, tendo como base o uso do semi-metal Antimônio (TEMPONE; ANDRADE, 2008). No Brasil, o medicamento à base de antimônio pentavalente, utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose (nos casos de infecção por *Leishmania braziliensis* e outras espécies, exceto *L. guyanensis*), é o Antimoniato de Metilglucamina (Glucantime[®]) [MANSUETO et al., 2014; BRASIL, 2017]. Esse composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metilglucamina, sendo a última obtida previamente a partir da aminação redutora da glicose em presença de metilamina (RATH et al., 2003).

Quanto ao uso do antimonial pentavalente em sistemas nanoestruturados, há poucos relatos na literatura, como o descrito por Villa (2010) que utilizou o Antimoniato de Metilglucamina em nanoemulsão tópica em úlceras de leishmaniose cutânea em modelo murino, com efeito benéfico no controle da parasitose e na cura da lesão, mas sem significância estatística; e o de Sousa-Batista et al. (2017) que demonstraram que nanopartículas carregadas com Antimoniato de Meglumina tem grande potencial para melhorar eficácia no tratamento da Leishmaniose Visceral. Entretanto, vários estudos tem mostrado o uso de nanopartículas (NPs) de metais e semi-metais (ouro, prata, cobre, magnésio e outros) contra as leishmanioses (BARBOZA-FILHO et al., 2012; JEBALI; KAZEMI, 2013; JEBALI et al., 2014; CHAKRABORTY et al., 2014).

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que vem modificando substancialmente a forma como os diversos tipos de materiais são utilizados em diversas áreas dentre elas, a farmacêutica (ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2011) podendo ser utilizada para solucionar problemas relacionados a fármacos e medicamentos, destacando-se os lipossomas, nanomicelas, nanoemulsões e

nanopartículas (KUAN et al., 2012; VALCÁRCEL; LÓPEZ-LORENTE, 2014), com a capacidade de veicular fármacos pouco solúveis, direcionar esses ativos para seus alvos específicos, o que gera um aumento da biodisponibilidade e consequente melhoria na eficácia terapêutica (LUCENA, 2014).

Neste trabalho foi proposta a estabilização com ligantes orgânicos e a caracterização de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb^{5+}) para posterior aplicação no tratamento experimental contra Leishmaniose Cutânea.

MATERIAL E MÉTODOS

As suspensões com NPs Sb^{5+} foram preparadas no Laboratório de Química Inorgânica da Universidade de Helsinki, Finlândia, pelos Profs. Dr. Andriy Grafov e Dra. Iryna Grafova, e concedidas para a realização dos ensaios pré-clínicos através de parceria e acordo Internacional entre o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e a Universidade de Helsinki, pelo programa VAIKUTUS – FP7 – PEOPLE – IRSES – 295262. Estas possuem Depósito de Pedido de Patente Nacional nº BR 10 2013 02961800 pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sendo feita a descrição da produção da mesma.

As suspensões com NPs Sb^{5+} foram mantidas em temperatura ambiente (TA) e em seguida, foram estabilizadas, ou seja, funcionalizadas por diferentes ligantes orgânicos em suas superfícies. Dentre os ligantes orgânicos ensaiados estão: N-metil-D-glucosamina (NMGA) [Sigma, Aldrich], D-pantenol (DP) [Sigma, Aldrich], N-acetil-D-glucosamina (NAGA) [Sigma, Aldrich], Espermidina 99% (ACROS Organics), Polietileno Glicol (PEG) [Sigma, Aldrich] e Glicerol (Sigma, Aldrich).

Após a caracterização das NPs foi determinada a concentração de Antimônio pentavalente presente nas suspensões e a técnica de escolha foi a Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS), que possui limites de detecção suficiente para estudos com esse tipo de elemento químico (GARBÓS; BULSKA; HULANICKI, 2000).

Caracterização das NPs Sb^{5+} : fatores como tamanho, forma, composição, carga elétrica superficial, cor, atividade catalítica e estabilidade são dados importantes na nanotecnologia. Dentre esses parâmetros, um dos mais importantes é o tamanho das nanopartículas. Deste modo, foram utilizadas 2 técnicas (microscopia e espectroscopia) para avaliar as características das NPs Sb^{5+} aqui estudadas. São elas:

- **Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS):** a estabilidade e o tamanho hidrodinâmico das NPs foi medido em Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), onde 1,5 mL das suspensões com NPs Sb^{5+} foram mensuradas ao serem analisadas em Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Filadelfia, PA). Foram realizadas análises em triplicatas para obter uma distribuição do tamanho médio das NPs em número. O cálculo do tamanho das partículas foi feito a partir da média de cada amostra medida incluindo todos os desvios padrão. O mesmo equipamento foi utilizado para medir o potencial Zeta (ζ) das suspensões.

- **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):** a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) também foi utilizada para determinar o tamanho das NPs. E as fotomicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão FEI TECNAI G12 Spirit-Twin com fonte LaB_6 e operando com uma voltagem de aceleração de 120 kV, equipado com um fundo montado com câmera FEI CCD Eagle-4k (Eindhoven, Holanda).

Determinação de Antimônio nas suspensões com NPs Sb^{5+} : a determinação de elementos químicos é normalmente uma tarefa com grande dificuldade, uma vez que os métodos e técnicas envolvidas requerem versatilidade, especificidade, exatidão e sensibilidade (SANTOS, 2006).

- **Instrumentação por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS):** as medidas foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite, usando atomização eletrotérmica e detecção

simultânea, fabricado pela Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA), modelo SIMAA 6000. Foram utilizados tubos de grafite do tipo THGA, lâmpada multi-elementar de cátodo oco (HCL) [Perkin Elmer Lumina™]. A determinação de antimônio foi realizada ao comprimento de onda $\lambda = 217,6$ nm. Largura da fenda utilizada foi 0,7 nm e o fluxo de gás purga (Argônio 99.999%, White Martins) de 250 mL/min^{-1} , conforme recomendações do fabricante.

O volume pipetado para dentro do tubo de grafite foi de $20 \mu\text{L}$ tanto para a amostra diluída quanto para as soluções de calibração. Como modificador químico foi adicionado $5 \mu\text{L}$ de nitrato de paládio + $3 \mu\text{L}$ nitrato de magnésio. O programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de Sb em urina e soro foi otimizado e está mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Programa de aquecimento para determinação de Sb em suspensões de NPs Sb^{5+} por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) usando Pd^{2+} e Mg^{2+} como modificador.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (segundos)	Permanência (segundos)	Vazão de Argônio mL min^{-1}
1	110	1	30	250
2	130	15	30	250
3	1300	10	20	250
4	2300	0	5	0
5	2500	1	3	250

Fonte: Sargentini Jr. (2014).

- **Procedimento para a Atomização:** todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada de alta pureza (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtida em sistema Purelab Ultra, ELGA. Ácido Nítrico (65% Suprapur®, Merck) foi utilizado para preparar todas as soluções em meio ácido. Soluções analíticas de referência contendo 10,0; 20,0; 40,0 e $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb foram preparadas por sucessivas diluições da solução padrão para absorção atômica Titrisol® (Merck) contendo Sb (1000 mg L^{-1}) em meio de 0,1% (v/v) HNO_3 . As suspensões com NPs Sb^{5+} foram diluídas de 20.000 a 40.000 vezes com ácido nítrico 1% v/v.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de obter suspensões de NPs Sb^{5+} estáveis, diversos ligantes orgânicos foram ensaiados. No entanto, foram selecionadas apenas as que apresentaram melhor estabilidade (Tabela 4), primeiramente por análise visual (precipitação) e posteriormente por análises técnicas.

Tabela 4 - Suspensões com nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb^{5+}) e os respectivos ligantes orgânicos selecionadas.

Suspensões de NPs Sb^{5+}	Ligantes Orgânicos
ETSbL1[a]	N-metil-D-glucosamina (NMGA)
ETSbL2	D-pantenol (DP)
ETSbL1[b]	N-metil-D-glucosamina (NMGA)

Os ligantes orgânicos N-metil-D-glucosamina (NMGA) é um derivado de açúcares e o D-pantenol (DP) é uma pró-vitamina do complexo B (IDSON, 1993; CORDEIRO, 2012), e ambos foram determinantes na não agregação das NPs Sb^{5+} , mostrando seu potencial uso na estabilização de NPs. O emprego de agentes estabilizantes está diretamente relacionado com o controle da forma, tamanho e distribuição de tamanho na síntese de NPs, devido ao fato de formarem uma cobertura (DUPONT; SCHOLTEN, 2010).

Segundo Garcia (2011) partículas finas, incluindo as em escala nanométrica, devido à sua grande superfície, frequentemente se aglomera formando partículas secundárias a fim de minimizar a área total e com isso baixar a tensão de superfície do sistema. Por exemplo, as nanopartículas são termicamente instáveis e tem tendência natural de se agregar e crescer. Essas aglomerações são causadas por forças de Van der Waals e/ou forças que tendem a diminuir a energia de superfície do sistema, além dos movimentos Brownianos que garantem que as NPs colidam todo o tempo umas com as outras, resultando na formação dos aglomerados (FINKE, 2002; GARCIA, 2011). Desta forma, o grande desafio consiste exatamente em preparar nanomateriais estáveis (ou seja, que permaneçam nesta escala de tamanho sem sofrer decomposição e sem agregação e crescimento) e

monodispersos (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951; BROWN; HUTCHISON, 2001). Assim, a utilização de ligantes orgânicos foi essencial para dispersar e estabilizar as NPs aqui estudadas.

Por se tratar de suspensões contendo NPs e considerando que quase todos os materiais particulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície, também foi realizado o estudo da estabilidade das NPs Sb^{5+} por meio de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) através da medida do potencial zeta (potencial ζ) das amostras, pois é o modo padrão de se medir carga eletrostática superficial de uma partícula, ou seja, é um indicador útil dessa carga e é avaliado para prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais. O resultado obtido mostra valor absoluto em torno de $-49,8$ mV (milivolts) [Figura 12].

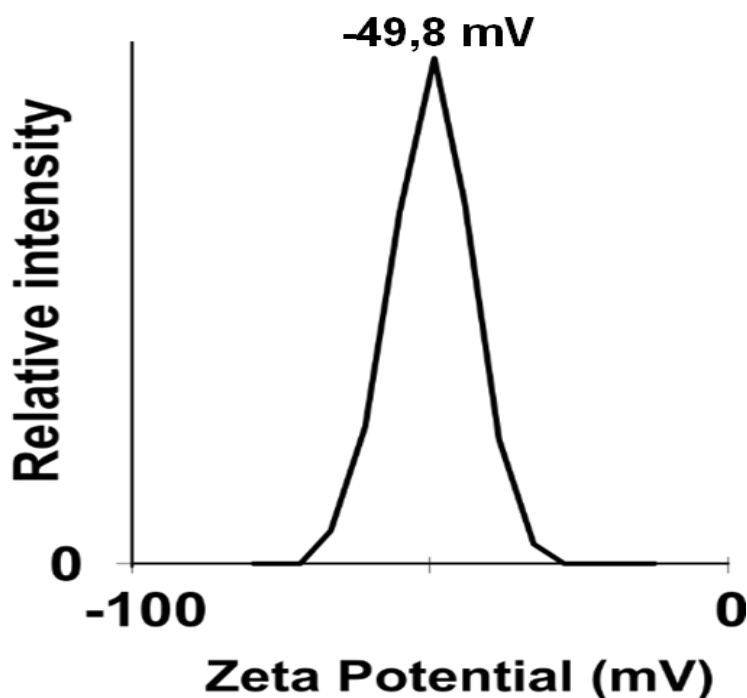


Figura 12 - Distribuição do potencial zeta (ζ) da suspensão ETSbL1[a] medido por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

Casanova (2011) elucida que quanto maior o potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem, e essa força supera a tendência natural à agregação, e que o valor ideal deve ser maior ou igual a ± 30 mV. Logo, analisando esses dados pode-se dizer que a suspensão

ETSbL1[a] mostrada na figura 12 é uma suspensão defloculada, ou seja, uma suspensão estável.

Em seguida as NPs Sb^{5+} foram caracterizadas quanto ao tamanho e morfologia. Também foi investigada a concentração de Sb^{5+} presente nas suspensões.

Quando verificado o tamanho das NPs Sb^{5+} medido por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e analisado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi possível constatar que estas possuem um tamanho médio de 42 nanômetros (Figura 13).

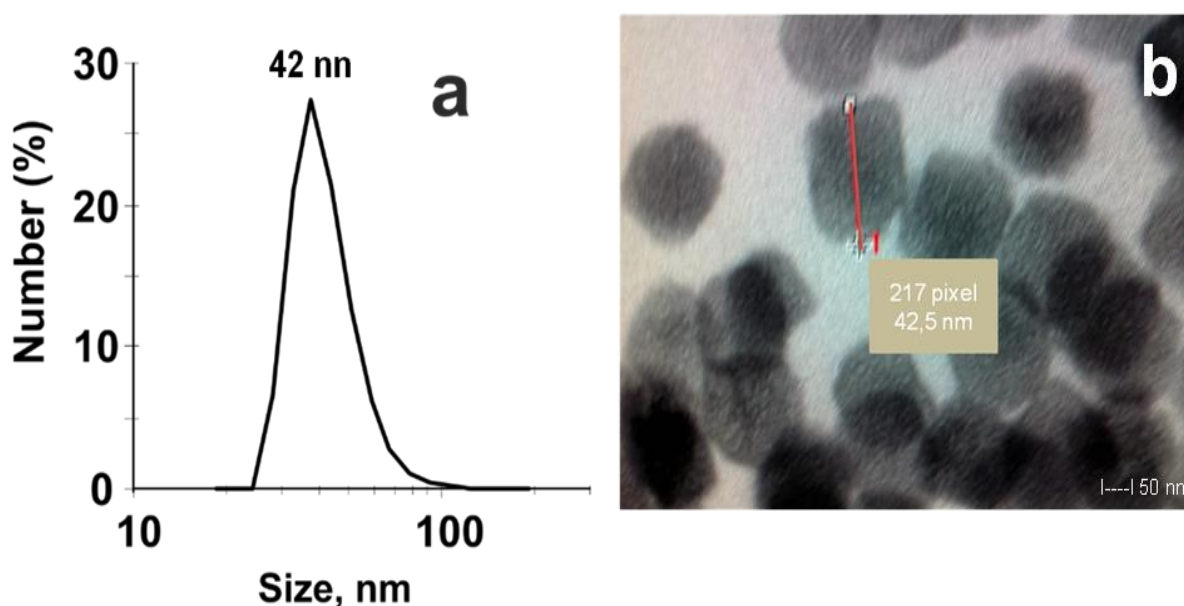


Figura 13 - Distribuição do tamanho médio das partículas da suspensão ETSbL1[a], medido por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) [a] e fotomicrografia por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) [b]. A barra de escala equivale a 50 nm.

Fierascu, Ion e Dumitriu (2008) esclarecem que para um material ser considerado numa escala nanométrica deve ter pelo menos uma das dimensões externas com tamanho igual ou inferior a 100 nanômetros (nm), com aumento da atividade química do material devido ao aumento da área de superfície específica (THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004). Astruc et al. (2005) acrescentam que uma alternativa na busca de obter maior domínio sobre o controle da distribuição de tamanho das NPs é o revestimento,

estabilização e/ou funcionalização das NPs. Sendo assim, sugere-se que as NPs aqui testadas possuem diversas propriedades que permitem sua aplicação em estudos futuros.

A Figura 14 mostra claramente a morfologia das NPs Sb^{5+} através da análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). É possível notar, através das fotomicrografias, que as NPs Sb^{5+} preparadas com os ligantes NMGA e DP exibem formato esférico, dispersas e com superfície lisa.

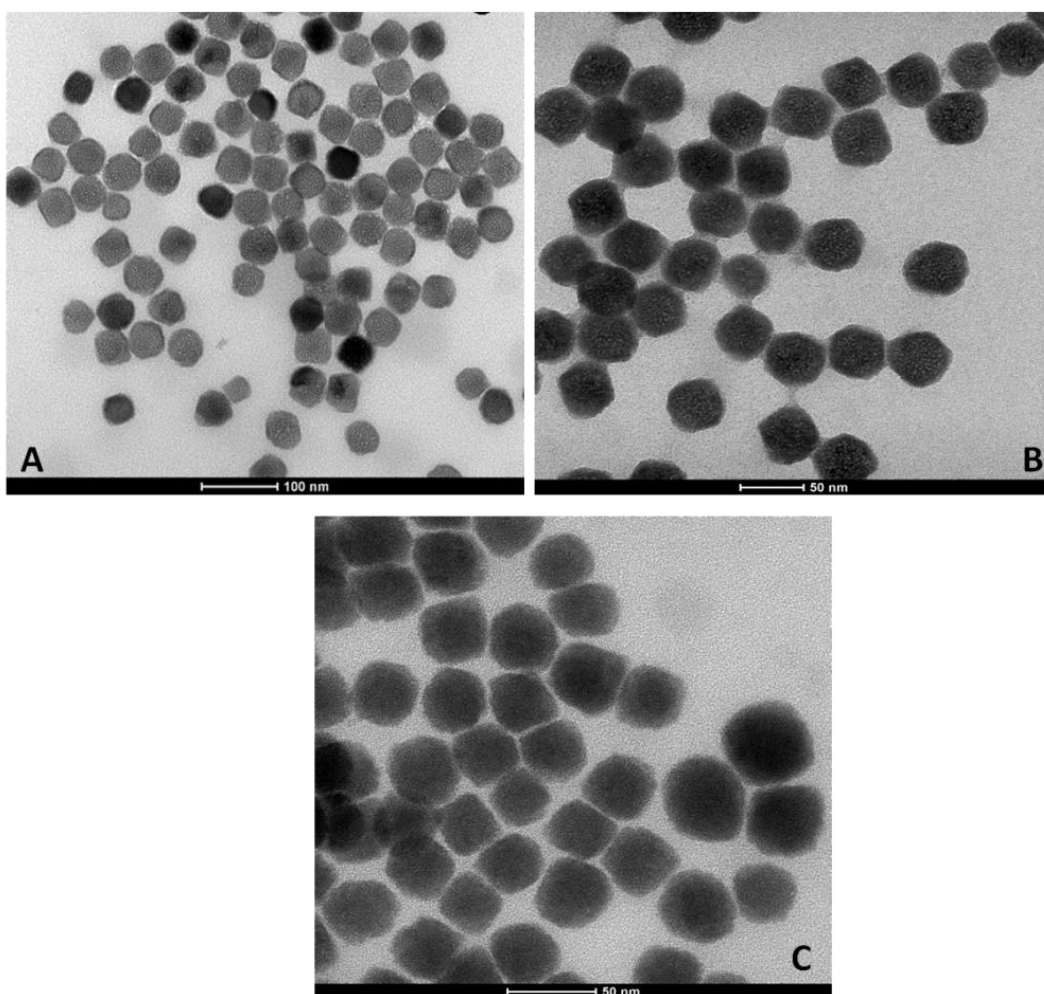


Figura 14 - Fotomicrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas de antimônio pentavalente. (A) ETSbL1[a] estabilizada com N-metil-D-glucosamina (NMGA); (B) ETSbL2 estabilizada com D-pantenol (DP); e (C) ETSbL1[b] estabilizada com N-metil-D-glucosamina (NMGA). As barras de escala equivalem a 50 e 100 nm.

Nota-se que as NPs exibem morfologias semelhantes. No entanto, é possível observar que as NPs mostradas na figura 14B apresentam-se interligadas, julgando ser o ligante D-pantenol (DP) presente nesta suspensão.

Os resultados obtidos quanto ao tamanho e morfologia das NPs Sb^{5+} demonstram que estas apresentam adequada qualidade com uma estreita distribuição de tamanho e forma, independente dos ligantes utilizados na sua preparação.

Por fim, foi possível fornecer os valores da concentração de antimônio pentavalente em miligramas/mL das suspensões de NPs após análise por Instrumentação por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS).

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 5), foram confirmadas as diferentes concentrações de antimônio pentavalente nas suspensões produzidas, sendo a suspensão ETSbL2 a menos concentrada com 1,62 mg/ Sb^{5+} /mL e ETSbL1[b] a mais concentrada com 10,21 mg/ Sb^{5+} /mL.

Tabela 5 - Concentração de antimônio pentavalente (NPs Sb^{5+}) presente em cada suspensão determinada por GF AAS.

Suspensões de NPs Sb^{5+}	mg/Sb^{5+}/mL
ETSbL1[a]	2,30
ETSbL2	1,62
ETSbL1[b]	10,21

Neste contexto, vale ressaltar que o Glucantime[®] é comercializado em ampolas de 5 mL, e cada mL contém 81 mg/ Sb^{5+} (BRASIL, 2017). Portanto, visando à correlação dos resultados, é possível notar que as suspensões com NPs Sb^{5+} apresentam concentrações/mL até 50x menor quando comparadas a droga comercial.

Desta forma, as diferentes concentrações de Sb^{5+} presente nas suspensões não gerou a formação de aglomerados de NPs, sendo possível a identificação de cada partícula, indicando que os ligantes orgânicos utilizados estabilizam às NPs contra aglomeração.

CONCLUSÃO

As nanopartículas para que possam ser eficientemente empregadas em aplicações tecnológicas e biomédicas devem ser capazes de se manterem estáveis ao longo do tempo, sem que haja perda de suas propriedades, por meio de decomposição ou agregação, conservando sua atividade.

Dessa maneira, a pesquisa mostrou que é viável a estabilização de NPs Sb^{5+} com diferentes ligantes orgânicos, resultando na formação de NPs com tamanho e forma controlados. Sendo assim, as NPs Sb^{5+} aqui caracterizadas possuem potencial para futuras aplicações *in vitro* e *in vivo*, especificamente no tratamento da leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIAS

ASTRUC, D. et al. Nanoparticles as recyclable catalysts: the frontier between homogeneous and heterogeneous catalysis. **Angew Chem Int.**, 44:7852-72, 2005.

BARBOZA-FILHO, C. G. et al. The influence of natural rubber/Au nanoparticle membranes on the physiology of *Leishmania brasiliensis*. **Experimental Parasitology**.v. 130: 2, p. 152–158, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017. 190 p.

BROWN, L. O.; HUTCHISON, J.E. Formation and electron diffraction studies of Ordered 2-D and 3-D superlattices of amine-stabilized gold nanocrystals. **J. Phys. Chem. B.**, v.105, p. 8911-8916, 2001.

CAPPELARO, A. M. S. **Desenvolvimento de Nanoemulsão combinando os fármacos leishmanicidas Miltefosina e Fluconazol para uso oral**. 76p. Dissertação de mestrado – Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, 2012.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de química de São Carlos, 2011.

CHAKRABORTY, S. et al. Novel Arsenic Nanoparticles are more effective and less toxic than as (III) to inhibit extracellular and intracellular proliferation of *leishmania donovani*. **Journal of Parasitology Research**, 2014.

CORDEIRO, T. A. **Novos tensoativos não-iônicos para CO₂ supercrítico: síntese e estudo de algumas propriedades**. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2012.

COPELAND, N. K.,; ARONSON, N. E. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. **Curr Opin Infect Dis**, 28:5, 426–437, 2015.

DUPONT, J.; SCHOLTEN, J. D. On the structural and surface properties of transition-metal nanoparticles in ionic liquids. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1780, 2010.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly (ethylene glycol) grafting density. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 178-187, 2011.

FIERASCU, R.C.; ION, R.M.; DUMITRIU, I. **Plasmonic Materials for Biomedical Applications**. In: 6th Workshop on European Scientific and Industrial Collaboration on promoting Advanced Technologies in Manufacturing. WESIC'08; Bucharest, Romania, 2008.

FINKE, R.G. Transition-metal Nanocluster. Chapter 1, D.L. **Feldheim New York, 2002**.

GARBÓS, S.; BULSKA, E.; HULANICKI, A. Spectrochim. **At Spectrosc**, 21:128-131. 2000.

GARCIA, Marcus Vinicius Dias. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

IDSON, B. Vitamins and the skin. **Cosmet Toil**, 1 08(2): 79- 94, 1993.

JEBALI, A. et al. Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation. **Drug Chem Toxicol.**, 37(4):400-9. 2014.

JEBALI, A.; KAZEMI. B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicol In Vitro.**, 27(6):1896-904, 2013.

KUAN, C-Y. et al. Nanotech: propensity in foods and bioactives. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 52:55–71. 2012.

LUCENA, P. A. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas Poliméricas Contendo Itraconazol**. Dissertação de mestrado apresentada ao

programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás. Goiânia 2014.

MANSUETO, P. et al., Leishmaniasis in travelers: A literature review, **Travel Medicine and Infectious Disease**, xx, 1-19, 2014.

RATH, S. et al . Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

SANTOS, E.P. **Determinação de espécies de arsênio, antimônio e chumbo em antimoniato de meglumina por espectrometria de absorção atômica após extração em fase sólida**. 2006. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria.

SOUSA-BATISTA, A. J. et al. Polycaprolactone Antimony Nanoparticles as Drug Delivery System for Leishmaniasis. **American Journal of Therapeutics**, 2017.

TEMPONE, A.G.; ANDRADE Jr, H.F. Nanoformulations of pentavalent antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes demonstrate highest efficacy against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 67(2):131-136, 2008.

THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies**, 2004.

TURKEVITCH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. **Discuss. Faraday Soc.** v.11, p.55-57, 1951.

VILLA, M.F.L. **New pharmacological strategy based in nanotechnology against cutaneous leishmaniasis in Ecuador**. 2010. Tesis de grado (Magister en Microbiología) Universidad San Francisco de Quito.

VALCÁRCEL, M.; LÓPEZ-LORENTE, Á. Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry. 1st ed. **Elsevier B.V.**; 2014.

WHO. World Health Organization (2014) **Global Health Observatory Data – Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/GlobalHealthObservatory> . Acesso em: 21 abr. 2015.

CAPÍTULO III

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE NANOPARTÍCULAS DE ANTIMONIO PENTAVALENTE (NPs Sb⁵⁺)

CAPÍTULO III

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE NANOPARTÍCULAS DE ANTIMONIO PENTAVALENTE (NPs Sb⁵⁺)

Fabiane Veloso Soares^{1,3}, Pedro Rael Candido Domingos^{1,3}, Ana Flávia da Silva Chagas^{1,3}, Andriy Grafov², Antonia Maria Ramos Franco³

¹Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, Am, Brasil.

²Laboratório de Química Inorgânica, Departamento de Química, Universidade de Helsinki. Helsinki, Finlândia.

³Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Pesquisas em Ambiente, Saúde e Sociedade (CoSAS), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, Am, Brasil.

RESUMO

As Leishmanioses estão listadas no grupo de doenças negligenciadas, onde predominam reduzidos investimentos em pesquisas e na produção de novos medicamentos. O tratamento desta doença ainda é bastante complexo, utilizando vários agentes ativos, principalmente os Antimoniais Pentavalentes (Sb⁵⁺). No presente estudo, avaliaram-se os efeitos das nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em sistema *in vitro*. Os bioensaios indicaram que essas NPs apresentaram efeito tóxico nas concentrações mais altas de Sb⁵⁺. A suspensão de NPs Sb⁵⁺ mais promissora foi a ETSbL2 que apresentou maior atividade antileishmania com valor de CE₅₀ 1.05 mg/mL contras as formas promastigotas. Não foi notada a permanência de infecção nos macrófagos experimentalmente infectados quando tratados com NPs Sb⁵⁺ e alterações morfológicas foram observadas em macrófagos tratados com a amostra ETSbL1[b], devido a concentração elevada. Esses resultados encorajam para a progressão dos estudos dessas NPs em ensaios pré-clínicos experimentais como candidatas ao tratamento da LC.

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Bioensaio. Antimônio pentavalente. Nanopartículas.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma infecção causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida por fêmeas hematófagas de flebotomíneos vetores (PACE, 2014). O espectro clínico da doença varia de infecção assintomática a leishmaniose visceral fatal (MANSUETO et al., 2014). Encontra-se predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, apresentando-se endêmica em populações de baixa renda, com cerca de 350 milhões de pessoas em risco de contraí-la (WHO, 2010; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 1,1 a 1,6 milhões de casos de leishmaniose cutânea ocorrem todos os anos em 98 países abrangendo cinco continentes com 90% dos casos ocorrendo na Índia, Bangladesh, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (ALVAR et al., 2012).

O parasita *Leishmania* tem o seu ciclo biológico desenvolvido em dois hospedeiros, no hospedeiro vetor (inseto) como um parasita extracelular, alongado, flagelado conhecido como promastigota e no hospedeiro mamífero, vive como um parasita intracelular, de formato arredondado, sem locomoção conhecido como amastigota (GIUDICE et al., 2007; STRAZZULLA et al., 2013; HANDLER et al., 2015).

O tratamento desta doença ainda é bastante complexo, utilizando vários agentes ativos, principalmente os Antimoniais Pentavalente (Antimoniato de Meglumina e Estibogluconato de Sódio) administrados por via parenteral por 30 dias, devendo ser conduzido por profissionais da saúde. Este fator é limitante na terapia, já que é grande a ocorrência desta parasitemia em áreas rurais, onde o atendimento médico é precário, levando ao abandono do tratamento, aumentando o aparecimento de cepas resistentes ao medicamento (CROFT; COOMBS, 2003; BRASIL, 2017).

A segurança e eficácia das drogas utilizadas nessa terapêutica são consideradas bastante heterogêneas (REMÍGIO HENRIQUES; RUIZ; ARIAS, 2014). Desse modo, é necessário investir em novos testes com novas drogas ou com drogas já conhecidas, mas com inovação tecnológica para o tratamento da doença,

visto que, os atuais padrões terapêuticos consistem na utilização de fármacos que apresentam toxicidade, alto custo e provocam diversos efeitos colaterais.

Em busca de melhorar o atual cenário do tratamento da leishmaniose cutânea, nanomaterias, incluindo nanopartículas, tem sido extensivamente utilizado, devido principalmente as suas interessantes propriedades advindas da alta relação área/volume (CASANOVA, 2010), sendo eficaz na redução dos efeitos secundários, bem como pode apresentar um custo acessível (ITALIA et al., 2011).

No presente estudo, avaliou-se os efeitos das nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb^{5+}) contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leshmania) amazonensis* em sistema *in vitro*, tendo como controle o Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®]), a droga comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária: foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584), criopreservadas no criobanco de cepas de leishmanias do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/CoSAS/INPA. Para o cultivo das formas promastigotas foi utilizado o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co, USA), suplementado com soro fetal bovino inativado (SFBi) e 50 µg/mL de gentamicina, incubadas a 24 °C de acordo com Jaffe et al. (1984), e posteriormente utilizada para os bioensaios e criopreservação. As amostras foram criopreservadas em nitrogênio líquido, após amplificação em garrafas para cultivo de células (em poliestireno, área de crescimento de 25 cm², 50 mL, estéril, com tampa de rosca e gargalo inclinado) e centrifugação a 4.400 rpm por 15 minutos, com posterior lavagem do sedimento e ressuspensão deste em solução de criopreservação [10% de glicerina (Merck) em meio Schneider Drosophila Medium (SIGMA) contendo 30% SFBi].

Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*: para avaliar o crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, 10⁶

promastigotas/mL foram semeados em triplicata em meio de cultura RPMI completo e incubados em estufa a 25 °C +/- 1°C por sete dias. A cada 24 horas alíquotas da cultura foram retiradas e quantificadas em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 400x. A média aritmética das contagens foi utilizada para calcular o número de parasitas em 1 mL de cultura. O cálculo foi feito utilizando-se a fórmula: n° de parasitas = média dos quatro quadrantes maiores x inverso da diluição da amostra x 10⁴. Para o estudo foram utilizadas as formas promastigotas de cultivo axênico na fase final logarítmica, na qual ocorrem as formas consideradas infectantes. A curva foi construída graficamente utilizando o software GraphPad Prism[®] 6.0.

- Bioensaios para determinação da atividade antileishmania e da concentração efetiva 50% (CE₅₀) das NPs Sb⁵⁺: a atividade antileishmania das NPs Sb⁵⁺ foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Antes de cada experimento foi observada a motilidade flagelar e a morfologia geral dos parasitas para posterior comparação.

Como controle negativo foram utilizados parasitas na ausência das NPs Sb⁵⁺ e como controle positivo o Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®]) na concentração de 5,06; 2,53; 1,26 e 0,63 mg/Sb⁵⁺/mL. As suspensões com NPs Sb⁵⁺ (ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b]) foram diluídas em série (1:4, 1:8, 1:16, 1:32) em meio RPMI 1640 completo, já presente em placa de 96 poços em um volume final de 100 µL/poço. Assim, as concentrações de antimônio nas suspensões com NPs Sb⁵⁺ variaram de 0,575 – 0,071 mg/Sb⁵⁺/mL, 0,405 – 0,050 mg/Sb⁵⁺/mL e 2,555 – 0,320 mg/Sb⁵⁺/mL, respectivamente.

A cultura de formas promastigotas foi centrifugada a 4.400 rpm /15 minutos, lavadas e diluídas em RPMI 1640 completo, quantificadas em câmara de Neubauer, e ajustadas para obter a concentração parasitária de 10⁶ parasitas/mL, também em um volume final de 100 µL/poço de acordo com Fumarola, Spinelli e Brandonisio (2004). Posteriormente, esta concentração de promastigotas foi adicionada aos poços contendo as drogas diluídas, totalizando um volume final de 200 µL por poço. A placa do bioensaio, na presença de promastigotas, controles e nanoformulações, foi incubada em estufa a 25 °C durante 24, 48 e 72 horas.

Para avaliar a viabilidade celular foi empregado o método de contagem de células viáveis (utilizando o corante Azul de Tripán (Sigma, USA) e avaliando a motilidade celular) em câmara de Neubauer em microscópio óptico, aumento de 400x. Os resultados foram expressos em gráficos utilizando o software GraphPad Prism[®] 6.0.

Os bioensaios foram realizados em triplicata e a média do número de células viáveis foi utilizada para calcular por regressão linear, a CE_{50} (concentração efetiva para 50% das células). O valor da CE_{50} é utilizado para expressar os resultados das atividades das suspensões com NPS avaliadas e selecionar as que se apresentam mais ativas para estudos posteriores.

Atividade citotóxica em macrófagos de linhagem MJ774: macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em placas de cultivo celular de 12 poços contendo meio RPMI 1640 (Himedia) completo, os quais foram mantidos a temperatura de 37 °C e pressão de CO_2 a 5%. A cada 48 horas era observado o estado das células e realizado lavagem com RPMI, acrescentando meio de cultivo ao final da verificação.

As suspensões com NPs Sb^{5+} foram submetidas a testes para a determinação da concentração capaz de provocar a redução de 50% da população celular (CE_{50}) de macrófagos não infectados. Os macrófagos (10^5 células/mL) cultivados previamente em placa de cultura de 12 poços foram incubados na presença de diferentes concentrações de NPs Sb^{5+} . As concentrações utilizadas foram inferidas a partir da CE_{50} determinadas em promastigotas.

A incubação dos macrófagos foi em estufa por 37 °C por 24, 48, 72 horas na presença de NPs Sb^{5+} . Após o período de incubação foi adicionado 20µL do reagente MTT (brometo de 3-[4,5 dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazolium)/ Cell proliferation Kit I (Roche[®]) e após quatro horas de incubação foram adicionados 100 µL de solução de solubilização (TADA et al., 1986). Os macrófagos foram incubados por mais 12 horas e, em seguida, foram realizadas as leituras colorimétricas em espectrofotômetro (Bio-Tek[®]), utilizando os comprimentos de onda de 590 nm.

O cálculo para a obtenção do valor de CE_{50} foi realizado por regressão não linear, utilizando o software GraphPad Prism[®] 6.0. Os testes também avaliaram a

viabilidade celular por contagem de macrófagos viáveis com o corante Azul de Tripán como controle, corando apenas as células mortas (não quantificadas).

Verificação de viabilidade de formas amastigotas em macrófagos de linhagem MJ774 após exposição às NPs Sb⁵⁺: macrófagos da linhagem MJ774 foram cultivados em placas de cultivo celular de 12 poços contendo meio RPMI 1640 (Himedia) completo, os quais foram mantidos a temperatura de 37 °C e pressão de CO₂ a 5%. A cada 48 horas era observado o estado das células e realizado lavagem com RPMI, acrescentando meio de cultivo ao final da verificação. Cada poço recebeu 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFBi e 50 µg/mL de gentamicina, contendo uma concentração de 10⁵ macrófagos/mL. Cada poço contém uma lamínula de vidro estéril, em formato circular (13 mm de diâmetro), na qual os macrófagos aderem durante seu crescimento e multiplicação por 24 horas.

As células foram incubadas em estufa à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas para que ocorresse a aderência dos macrófagos as lamínulas. Após incubação, foi realizada lavagem com meio RPMI, a fim de retirar todas as células que não aderiram à lamínula, e então realizada a infecção dos macrófagos por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento, ajustadas para uma concentração 5x10⁶ células/mL, a ser incubada por poço, correspondente à proporção de 5 promastigotas por macrófago. Os parasitas foram adicionados, nesta concentração, ao volume de cada poço com macrófagos aderidos às lamínulas.

A placa novamente foi incubada durante 2h em estufa à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ para que houvesse infecção. Após esse período foram feitas três lavagens dos poços com meio RPMI 1640 completo, aquecido à 37 °C, para remover as promastigotas não fagocitadas e células não aderidas (ESLANI; TANNER, 1994; TEMPONE et al., 2004).

As NPs Sb⁵⁺ nas concentrações de 1,15; 0,81 e 5,10 mg/Sb⁵⁺/mL ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b], respectivamente, foram adicionadas sobre as lamínulas com macrófagos infectados em um volume final de 1mL/poço. Também foi adicionado o Glucantime[®] (8,1 mg/Sb⁵⁺/mL) e RPMI 1640 completo, como parâmetros de controle. A placa novamente foi incubada em estufa à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂

por 72 horas. Após o período de incubação, as lamínulas foram retiradas dos poços e coradas por Panótico Rápido (Laborclin[®]) e montadas em lâminas permanentes com o auxílio de Bálsamo do Canadá (Vetec[®] USA). Todo o bioensaio foi realizado em triplicata.

A resposta dos macrófagos e amastigotas intracelulares aos tratamentos foi verificada por observação das lamínulas impregnadas com macrófagos sob microscópio óptico em 1000x. Foi feita a contagem de 100 células/lamínula, especificando o número de macrófagos infectados, de amastigotas intracelulares por macrófago e de macrófagos não infectados. Desta forma, foram estabelecidas as taxas de infecção dos macrófagos em cada lamínula, e por fim, obteve-se a média da taxa de infecção entre as triplicatas. As médias dos percentuais de infecção de macrófagos, estabelecidas na presença de cada droga, foram comparadas com a taxa de infecção média do controle negativo (macrófagos infectados e não tratados).

Alterações da morfologia celular foram observadas por microscopia óptica em 1000x. Os resultados foram expressos em gráficos utilizando o software GraphPad Prism[®] 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do perfil de crescimento *in vitro* de *L. (L.) amazonensis*

Para *Leishmania* spp. a determinação da fase exponencial e da fase estacionária de crescimento é importante uma vez que autores sugerem uma associação entre a fase de crescimento da cultura e o sucesso na obtenção e manutenção de amastigotas axênicos (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998).

Por conseguinte, a contagem das promastigotas foi realizada em intervalos de 12 horas até a observação de menos de 10% de sobrevivência. A curva de crescimento estabelecida para os parasitas apresentou perfil típico conforme amplamente descrito para *L. (L.) amazonensis* (SILVA, 2008; ALMEIDA, 2012; WYREPKOWSKI, 2016), quando o padrão da curva de crescimento mostra claramente as seguintes fases da proliferação celular: fase lag (adaptação ao meio

artificial), fase exponencial de crescimento (fase logarítmica) entre 1 e 4 dias (36 - 96h), fase estacionária, compreendida entre 4 e 5 dias (96 - 120h) e de declínio, a partir do sétimo dia (Figura 15).

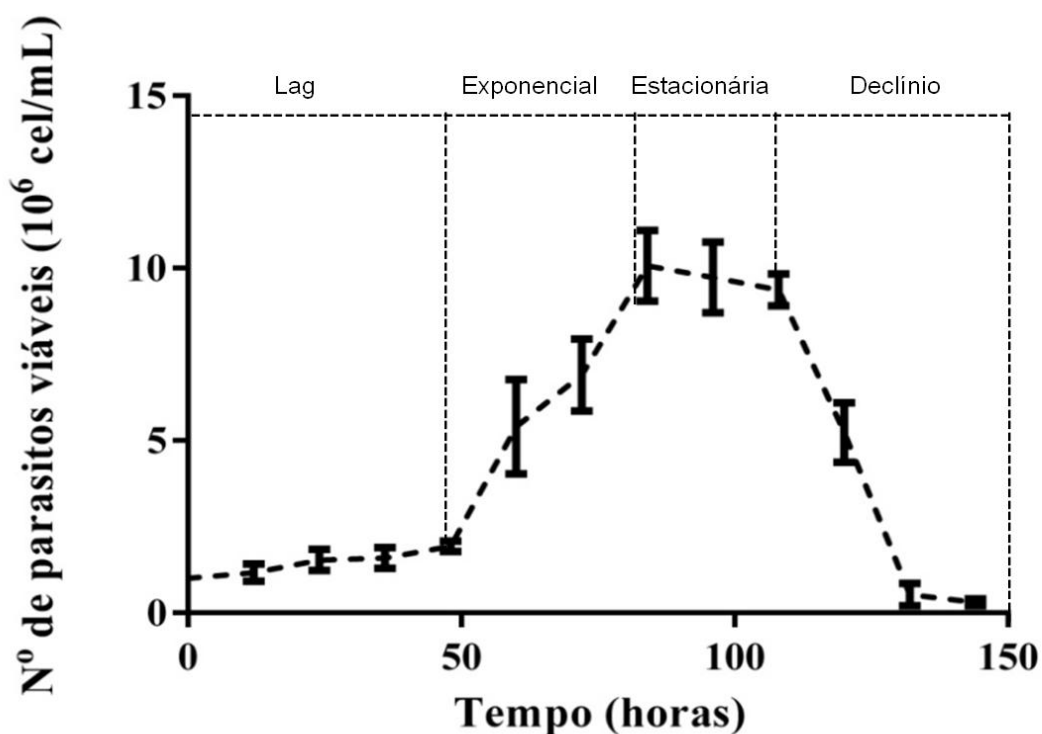


Figura 15 - Curva de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) acompanhada por 7 dias, com contagem diária. Os valores expressam a média de três determinações e são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Em meio de cultura *in vitro* as formas promastigotas diferenciam-se em formas metacíclicas infectantes, reproduzindo o processo de metaciclogênese que acontece no hospedeiro invertebrado (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998; SILVA, 2008). Portanto, neste estudo em todos os experimentos com formas promastigotas, optou-se por utilizar os parasitas no 4º dia do crescimento na 4ª passagem em cultivo.

Avaliação da sensibilidade de formas promastigotas as NPs Sb⁵⁺

A avaliação da atividade contra promastigotas e a determinação da concentração capaz de provocar a redução de 50% do crescimento dos parasitas foram realizadas através da Concentração Efetiva (CE₅₀), que segundo Silva (2016)

deve ser realizada com a intenção de verificar se as NPs estariam sendo eficazes leishmanicida ou se sua presença estaria sendo um fator indutor de toxicidade.

A tabela 6 apresenta os valores calculados de CE_{50} da avaliação das suspensões de NPs Sb^{5+} contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Observa-se que a suspensão mais promissora foi ETSbL2 com CE_{50} de 1,05 mg/mL em 72 horas de incubação. Resultado que pode estar relacionado tanto com a baixa concentração de antimônio pentavalente quanto com o ligante orgânico utilizado.

Tabela 6 - Valores de CE_{50} (mg \pm Desvio Padrão/DP), calculados por regressão linear (modelo Deming) das suspensões de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb^{5+}) após 24, 48 e 72 horas de incubação com promastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Suspensões de NPs Sb^{5+}	Valores de CE_{50} /Tempo de Incubação		
	24h (mg \pm DP)	48h (mg \pm DP)	72h (mg \pm DP)
ETSbL1[a]	4,58 \pm 0,01	3,7 \pm 0,02	4,17 \pm 0,03
ETSbL2	1,26 \pm 0,01	1,41 \pm 0,01	1,05 \pm 0,01
ETSbL1[b]	8,74 \pm 0,01	*	*
Glucantime ^{®a}	55,47 \pm 0,04	74,77 \pm 0,01	20,23 \pm 0,01

* = acima do valor máximo testado. ^a Droga comercial.

Silva (2016) utilizando NPs contendo o derivado do 2-amino-tiofeno (SB-83) contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* descreve que o CE_{50} foi menor onde havia uma maior quantidade de NPs, com valor de 3,37 μ M em 72 horas de incubação, o que considerou como leishmanicida.

Peculiarmente com a espécie *L. (L.) amazonensis* são raros os estudos que testam NPs. Por outro lado, espécies como *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) tropica* apresentam diversos estudos com esse sistema. Beheshti et al. (2013) descreve o CE_{50} de 1,62 \pm 0,6 das nanopartículas de Selênio biogênico (NPs Se) testadas contra promastigotas de *L. (L.) major*. Chakraborty et al. (2014) avaliaram a atividade de nanopartículas de Arsênio (NPs As) e obtiveram CE_{50} no valor de 2,37 μ M para *L. (L.) donovani*.

Um estudo apresentado por Soflaei et al. (2012) apresentou uma redução de 50% no número de parasitas quando utilizaram NPs de sulfeto de antimônio em cultura de promastigota de *L. (L.) infantum*. Outra atividade antileishmania promissora foi mostrada por Ahmad et al. (2015) empregando NPs de prata (NPs Ag) e ouro (NPs Au) contra promastigotas *L. (L.) tropica* com um valor CE_{50} de 4,37 e 5,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

De forma similar, Mahmoudvand et al. (2014) avaliaram a atividade antileishmania de nanopartículas de Selênio biogênico isoladas (NPs Se) e em combinação com Antimoniato de Meglumina (AM plus NPs Se) contra cepas de *L. (L.) tropica* sensível e resistente ao Glucantime[®]. Várias concentrações de NPs foram testadas e inibiu significativamente ($p < 0,05$) o crescimento das promastigotas de ambas as cepas de uma maneira dose dependente, com valores de CE_{50} para NPs Se com $2.7 \pm 0.3 / 3.6 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$ e de AM plus NPs Se com $1.5 \pm 0.43 / 2.8 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$, cepas sensível e resistente ao Glucantime[®] respectivamente, refletindo efeitos leishmanicidas eficazes.

Rossi-Bergmann et al. (2012) avaliaram o potencial terapêutico de nanopartículas de prata preparados por dois processos distintos: pela síntese química (Chem-AgNP) e por biossíntese do fungo *Fusarium oxysporum* (Bio-AgNP), no tratamento de leishmaniose cutânea. Quando testado *in vitro* contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, Bio-AgNP foi quatro vezes mais potente do que a Chem-AgNP ($CE_{50} = 25 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$, respectivamente).

A atividade das NPs Sb^{5+} também foi analisada sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Quando avaliada a atividade em relação ao tempo de incubação na presença das suspensões testadas, ETSbL2 com CE_{50} de 1,26, 1,41 e 1,05 $\text{mg/Sb}^{5+}/\text{mL}$ nos períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, demonstrou uma diminuição na concentração de parasitas viáveis no decorrer do tratamento (Figura 16B), o que pode indicar uma atividade acumulativa desta amostra, impedindo a proliferação de células viáveis, seja por ação tóxica ou por inibição da atividade metabólica das promastigotas. Efeito semelhante é observado nos resultados com Glucantime[®], que nesses ensaios, a concentração variou de 5,06 a 0,63 $\text{mg/Sb}^{5+}/\text{mL}$ (Figura 16D).

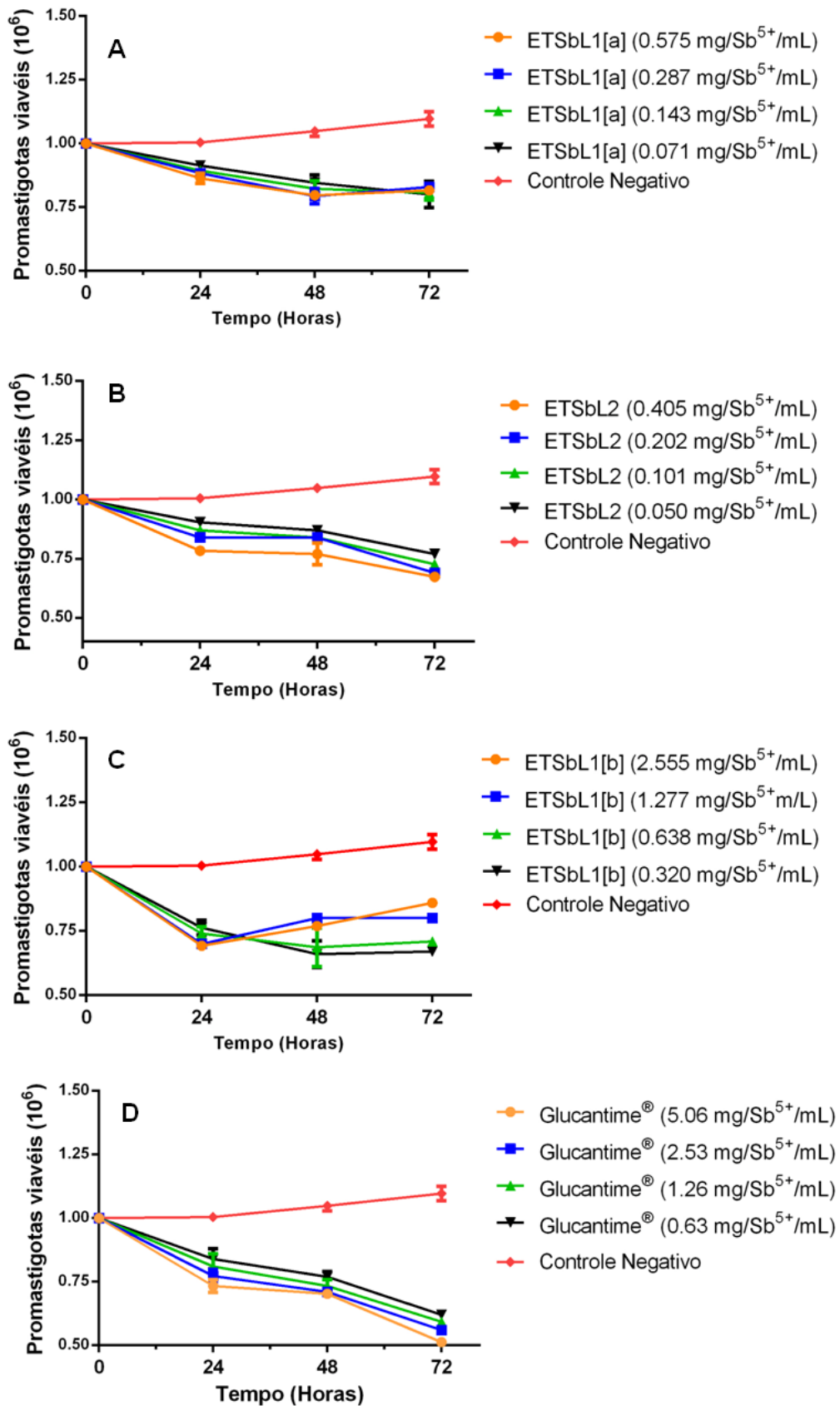


Figura 16 - Atividade das nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) frente à formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A - ETSbL1[a], B - ETSbL2, C – ETSbL1[b] e D - Glucantime® (controle positivo) e o controle negativo (concentração de parasitas em meio RPMI completo).

Nossos dados corroboram os de Soflaei et al. (2014). Estes autores avaliaram os efeitos das nanopartículas de selênio (NPs Se) em promastigotas de *L. (L.) infantum* e foi observada uma inibição do crescimento dependente da dose testada em 24, 48 e 72h de incubação, sendo que as reduções máximas de proliferação parasitária foram observadas em 72h de incubação, sugerindo efeitos inibitórios a estas NPs.

Dados similares são descritos por Chakraborty et al. (2014) ao avaliarem a atividade de nanopartículas de Arsênio (NPs As) e demonstrarem claramente que o tratamento por 72 horas afetou o crescimento das promastigotas de *L. (L.) donovani*. Resultados diferentes são descritos por Beheshti et al. (2013) ao avaliar as nanopartículas de Selênio biogênico (NPs Se), revelando que a citotoxicidade das NPs Se contra as formas promastigotas de *L. (L.) major* foi maior em todos os tempos de incubação (24, 48 e 72h), comprovando que as NPs Se podem inibir a proliferação do parasita desde início do tratamento.

Outros estudos demonstram a diminuição da proliferação e atividade metabólica de *L. (L.) tropica* quando expostos as nanopartículas de prata (NPs Ag) e que esse efeito é aumentado ainda mais sob a luz ultravioleta (UV) [ALLAHVERDIYEV et al., 2011; RAHI et al., 2013].

Com relação à suspensão ETSbL1[a] os resultados mostram que houve atividade contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* nos tempos de exposição de 24 e 48 horas, com ênfase em 48 horas de incubação (Figura 16A), nas concentrações 0,575 e 0,287 mg/Sb⁵⁺/mL, com redução de promastigotas viáveis.

Na análise dos efeitos da suspensão ETSbL1[b] (Figura 16C) sobre a proliferação de *L. (L.) amazonensis*, observa-se discreta diminuição do crescimento das promastigotas nas primeiras 24 horas de exposição em todas as concentrações testadas, e após esse período as duas primeiras concentrações (2,555 e 1,277 mg/Sb⁵⁺/mL) exibiram crescimento das formas promastigotas. Em contrapartida, as duas últimas concentrações (0,638 e 0,320 mg/Sb⁵⁺/mL), nos tempos de exposição de 48 e 72 horas, apresentaram também discreta diminuição da proliferação de promastigotas viáveis.

Considerando o dado acima, acredita-se que no decorrer do período de exposição à suspensão ETSbL1[b] pode ter ocorrido aglomeração das NPs em 48 e 72 horas de incubação nas maiores concentrações (2,555 e 1,277 mg/ Sb⁵⁺/mL), pois foi possível observar precipitado de partículas nos poços das placas de cultivo durante a quantificação, não mostrando atividade sobre as formas promastigotas.

Ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico de MTT (sal de tetrazolium) das NPs Sb⁵⁺ em macrófagos de linhagem J774

Quando avaliado o efeito citotóxico das NPs Sb⁵⁺ sobre macrófagos de linhagem J774 incubados a 37° C por 72 horas, a suspensão ETSbL2 mostrou-se menos tóxica, apresentando 62,1% de viabilidade celular na primeira concentração (0,81 mg/Sb⁵⁺/mL) e 97,5% na última concentração testada (0,10 mg/Sb⁵⁺/mL). À medida que aumenta a concentração de NPs Sb⁵⁺ a viabilidade celular reduz, por exemplo, a suspensão ETSbL1[b] na concentração de 2,55 mg/Sb⁵⁺/mL causou toxicidade de 50% para as células (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito citotóxico das nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) em macrófagos de linhagem J774 incubados a 37° C por 72 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica (MTT).

Suspensões de NPs Sb⁵⁺	mg/Sb⁵⁺/mL	% viabilidade ± DP
ETSbL1[a]	*	*
	0,81	62,1 ± 1,11
	0,40	82,1 ± 3,59
ETSbL2	0,20	90,6 ± 9,52
	0,10	97,5 ± 7,48
	5,10	58,2 ± 12,89
	2,55	50,3 ± 1,62
ETSbL1[b]	1,27	80,9 ± 1,90
	0,63	85,4 ± 2,25

* Não foi possível avaliar.

Os valores médios de % de sobrevivência apresentados na tabela 7 indicam que esses valores são diferentes em todos os tratamentos e concentrações.

Viabilidade de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos de linhagem J774 após exposição às NPs Sb⁵⁺

Os macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* avaliados quanto aos efeitos tóxicos das NPs Sb⁵⁺ e comparados com os controles, não mostraram, por microscopia óptica (Figura 17), alterações morfológicas, ou seja, apresentaram menor efeito citotóxico, com exceção do tratamento com ETSbL1[b], a suspensão mais concentrada (Figura 17c), que apresentaram núcleo retraído e conteúdo citoplasmático reduzido em comparação aos demais tratamentos.

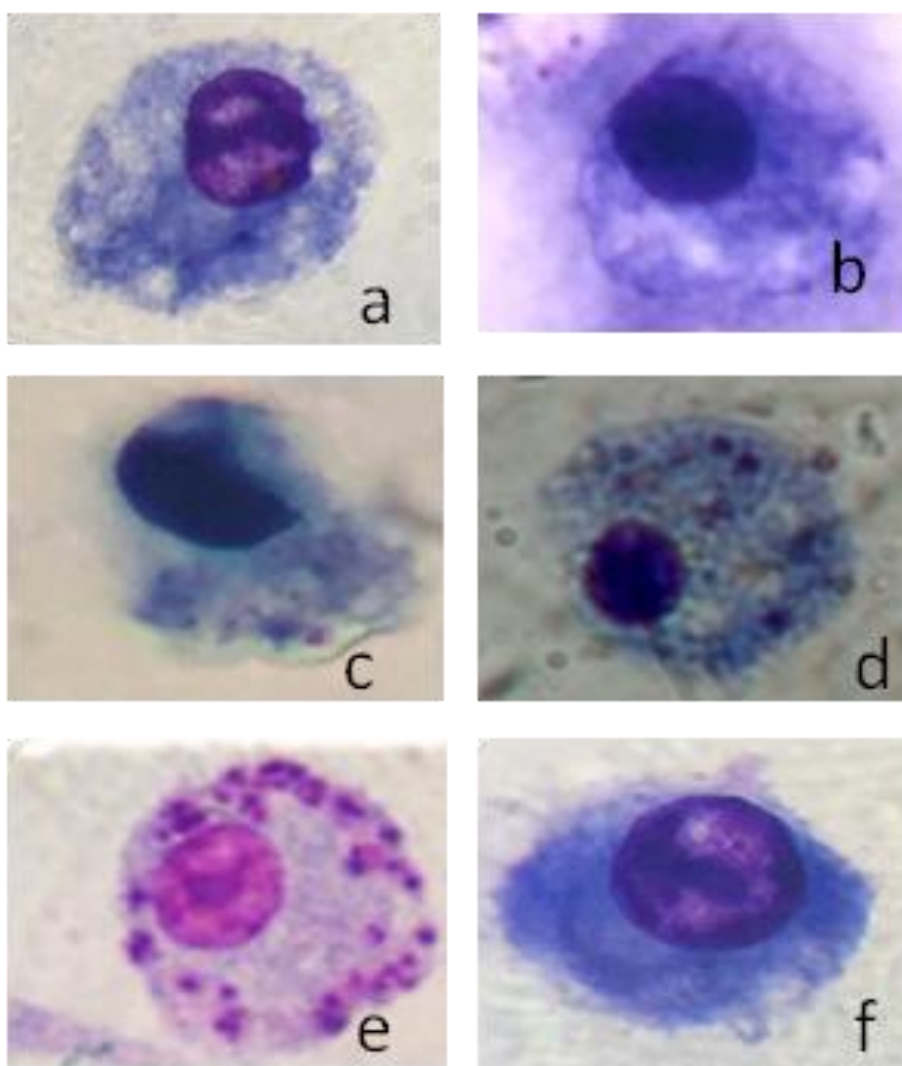


Figura 17 - Morfologia dos macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 72 horas após o tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺). a - macrófago infectado exposto a suspensão ETSbL1[a] (1,15 mg/Sb⁵⁺/mL), b - macrófago infectado exposto a suspensão ETSbL2 (0,81 mg/Sb⁵⁺/mL), c- macrófago infectado exposto a suspensão ETSbL1[b] (5,10 mg/Sb⁵⁺/mL), d - macrófago infectado exposto ao Glucantime® (8,1 mg/Sb⁵⁺/mL) [controle positivo], e- macrófago infectado e não tratado (controle negativo), f- macrófago não infectado e não tratado (controle negativo). 1000x.

Após 72 horas de tratamento, macrófagos infectados e tratados com 1,15 mg/Sb⁵⁺/mL (ETSbL1[a]) e 0,81 mg/Sb⁵⁺/mL (ETSbL2) [Figura 17a e b, respectivamente] demonstraram atividade bastante significativa quando analisadas quantitativamente, ou seja, com relação à eliminação do parasita, reduzindo ou até mesmo eliminando as formas amastigotas do meio intracelular, sem destruir a célula hospedeira; e morfológicamente, pois nenhuma alteração na morfologia da célula hospedeira foi observada. O aspecto do citoplasma dos macrófagos mostra diversos vacúolos, sugerindo a internalização da NPs, segundo descrito por Monteiro (2013).

A suspensão ETSbL1[b] foi utilizada na concentração 5,10 mg/Sb⁵⁺/mL e apresentou eficiência em conduzir à destruição ou eliminação do parasita do meio intracelular, mas causou efeitos citotóxicos observados após o tratamento (Figura 17c).

Silva (2008) relata que é plausível aceitar que células infectadas por *Leishmania* apresentem maior susceptibilidade aos efeitos citotóxicos de compostos que células não infectadas. Da mesma maneira, Brito et al. (2006) mostraram que macrófagos da linhagem J774 infectados por *L. (V.) braziliensis* foram significativamente mais sensíveis que as células não infectadas frente ao composto testado. Esta maior susceptibilidade de células infectadas pode ser decorrente de alterações no potencial de membrana do macrófago causadas pelo parasita (FORERO et al., 1999; QUINTANA et al., 2010).

Os resultados do presente trabalho corroboram os estudos de Monteiro (2013). Essa autora avaliou a citotoxicidade *in vitro* de NPs poliméricas associada à hidroximetilnitrofuril (nano NFOH) e indicou que a atividade leishmanicida em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* é referente à sua ação nos parasitas intracelulares e não pela destruição dos macrófagos.

Mahmoudvand et al. (2014) descrevem a atividade antileishmania de nanopartículas de Selênio biogênico (NPs Se) isoladas e em combinação com Antimoniato de Meglumina (AM plus NPs Se) contra cepas de *L. (L.) tropica* sensível e resistente ao Glucantime[®]. Da mesma forma, as NPs Se, especialmente em combinação com AM, reduziram significativamente o número médio de amastigotas de ambas as cepas em cada macrófago.

Soflaei et al. (2014) avaliaram os efeitos das nanopartículas de selênio (NPs Se) em amastigotas de *L. (L.) infantum* internalizadas em macrófagos peritoneais, com resultados já descritos ao longo dessa discussão, e relataram que essas NPs tem notavelmente menos efeitos tóxicos sobre os macrófagos infectados.

Jebali e Kazemi (2013) realizaram estudos em *L. (L.) major* para avaliar o efeito de NPs de prata (AgNPs), ouro (AuNPs), dióxido de titânio (TiO₂NPs), óxido de zinco (ZnONPs) e óxido de magnésio (MgONPs) através da exposição à luz infravermelho (IV), raio ultravioleta (UV) e em condições com pouca luz, e o resultado mostrou atividade tanto à luz UV quanto a IV, aumentando a propriedade leishmanicida das NPs, mas apresentaram alta citotoxicidade em macrófagos, indicando que essas NPs podem ter consequências positivas e negativas no tratamento da LC.

Jebali et al. (2014) também testaram NPs de óxido de magnésio (MgONPs) revestidas com lectina contra *L. (L.) major* em macrófagos peritoneais, evidenciando nenhuma toxicidade às células. Outro estudo realizado por Delavari et al. (2014) com a mesma espécie de *Leishmania* avaliaram o efeito de nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) *in vitro* e afirmaram os efeitos citotóxicos sobre os parasitas e macrófagos, e concluíram que NPs ZnO podem induzir a apoptose em *L. (L.) major* pela dose e tempo-dependente conforme a condição *in vitro*.

Nanopartículas a base de fosfato (NPCs, NPC0, NPC3 e NPC5) como transportadores de antimônio pentavalente (Sb⁵⁺) foram testadas contra amastigotas de *L. (L.) infantum* em macrófagos peritoneais e a infecção foi reduzida tanto por NPC3 contendo Sb⁵⁺ como por NPCs isoladas, mas NPC3 foi mais efetiva. Esses dados indicam o potencial dos NPCs como carreadores de Sb⁵⁺ direcionados especificamente a macrófagos, reduzindo a dosagem de Sb⁵⁺ sem reduzir a atividade leishmanicida (ALVARENGA et al., 2015).

A localização intracelular das formas amastigotas é responsável por prejudicar a adesão e a eficácia de drogas terapêuticas. Os sistemas de entrega de drogas permitem que os efeitos adversos causados por rotas problemáticas da administração sejam evitados de forma que a atividade antileishmania seja aumentada e a toxicidade do medicamento seja reduzida (ROMERO; MORILLA, 2008).

A avaliação da taxa de infecção dos macrófagos infectados e não tratados (controle negativo) apresentou-se em torno de 90-100%, em toda a cinética de acompanhamento, com citoplasma do macrófago apresentando inúmeras amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Figura 17e).

Não foi notada a permanência de infecção nos macrófagos experimentalmente infectados quando tratados com NPs Sb^{5+} , pois não foram observados parasitas viáveis após 72 horas de incubação, notando-se apenas a presença de vacúolos e detritos celulares no citoplasma dos macrófagos.

Quanto a avaliação do controle positivo, macrófagos infectados e expostos ao Glucantime[®] (8,1 mg/ Sb^{5+} /mL), estes apresentaram 28% de infecção após o período de exposição e não foi observada a presença de vacúolos contendo parasitas destruídos.

Em vista dos resultados apresentados, é suposto que após o tratamento com NPs, os parasitas intracelulares interrompem o seu desenvolvimento e são completamente destruídos dentro dos vacúolos, pois foi possível observar que todas as suspensões de NPs Sb^{5+} foram capazes de causar alterações morfológicas em formas amastigotas dentro de vacúolos parasitóforos, provavelmente devido à interrupção do desenvolvimento ou da multiplicação intracelular destes parasitas.

Assim, verifica-se que as NPs Sb^{5+} apresentam a capacidade de eliminar o parasita da célula hospedeira através do processo de destruição pela própria célula. Deste modo, ainda que mais trabalhoso, o teste em amastigotas intracelulares apresenta vantagens significativas em relação ao modelo de promastigota, uma vez que os resultados obtidos permitem avaliar não apenas a atividade leishmanicida das substâncias, mas também determinar a atividade citotóxica da mesma (SILVA, 2008).

Através desse estudo também foi possível perceber que não há um modelo padrão para os testes de novas substâncias, pois os estudos empregam diferentes concentrações das drogas, cepas do parasita, formas evolutivas e linhagens de macrófagos, dificultando a comparação dos resultados encontrados.

CONCLUSÃO

A busca por novos agentes terapêuticos para a Leishmaniose é constante e este trabalho revelou que o emprego de NPs no tratamento dessa doença, apesar de existir, ainda é incipiente. Além disso, não é observada a descrição mais detalhada da sua ação leishmanicida, dificultando o entendimento aprofundado desse nanossistema.

Precisamos lembrar que este estudo está testando o princípio ativo (antimônio pentavalente) do Glucantime[®], droga com comprovada segurança, eficácia e ação antileishmaniana, comercializada e disponível na terapêutica clínica, e que foi aproveitado sob uma nova abordagem tecnológica para o desenvolvimento de um novo agente leishmanicida associado a sistema nanoestruturado.

Em suma, observou-se que *in vitro* as suspensões de NPs Sb⁵⁺ comportam-se de modo diferente em ambas as formas evolutivas do parasita, apresentando atividade gradual durante todo o tratamento contra a forma promastigota e redução ou até mesmo eliminação das formas amastigotas intracelular, causando poucas alterações morfológicas na célula hospedeira, sugerindo baixa toxicidade, seja pela concentração de Sb⁵⁺ ou ligante utilizado, indicando um potencial leishmanicida.

Esses resultados encorajam para a progressão dos estudos dessas NPs em ensaios pré-clínicos experimental como candidatas ao tratamento da LC.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A. et al. Silver and gold nanoparticles from *Sargentodoxa cuneata*: synthesis, characterization and antileishmanial activity. **RSC Adv.**, **5**, p. 73793-73806, 2015.

ALMEIDA, G. G. **Complexo anfifílico de antimônio: atividade leishmanicida in vitro e eficácia de uma formulação tópica em modelo murino de leishmaniose cutânea.** 81 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia. 2012.

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. **Int J Nanomedicine**, **6**:2705-14, 2011.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. 7:e35671, 2012.

ALVARENGA, B. M. et al. Nanoparticle phosphate-based composites as vehicles for antimony delivery to macrophages: possible use in leishmaniasis. **J. Mater. Chem. B**, 3, p. 9250-9259, 2015.

BEHESHTI, N. et al. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*. *In vitro* and *in vivo* studies. **J Trace Elem Med Biol**, 2013.

BISWARO, S. L. **Efeito das nanopartículas contendo itraconazol e recobertas com manose sobre leishmaniose visceral estudo *in vitro***. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017. 190 p.

BRITO, S. et al. Eficácia de um ácido kaurênico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Biomédica**, v. 26, supl. 1, p. 180-187, 2006.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de química de São Carlos, 2011.

CHAKRABORTY, S. et al. Novel Arsenic Nanoparticles Are More Effective and Less Toxic than As (III) to Inhibit Extracellular and Intracellular Proliferation of *Leishmania donovani*. **Journal of Parasitology Research**, 2014.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**. 2003;19(11):502-508.

CYSNE-FINKELSTEIN, L. et al. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Exp Parasitol.**, v. 89, n.1, p. 58-62, 1998.

DE VRIES, H.J.; REEDIJK, S.H.; SCHALLIG, H.D. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **Am J Clin Dermatol**, 16: 99-109, 2015.

DELAVARI, M.; et al. In Vitro Study on Cytotoxic Effects of ZnO Nanoparticles on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). **Iranian Journal of Parasitology.**, 9(1):6-13, 2014.

ESLAMI, Z.; TANNER, C.E. Time course and intensity of infection *in vitro* in the resident peritoneal macrophages of resistant and susceptible mice exposed to

different doses of *Leishmania donovani* pro-mastigotes. **Int J Parasitol** 24: 743-747, 1994.

FORERO, M.E., et al. *Leishmania amazonensis* infection induces changes in the electrophysiological properties of macrophage-like cells. **Journal of Membrane Biology**, 170, 173–180. 1999.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Res in Microbiol**, v. 155: 244-230, 2004.

GIUDICE A. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infect Dis** 2007;7:7.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis Clinical perspectives. **J Am Acad Dermatol**, v. 73, n. 6: 897–908, 2015.

ITALIA, J.L.; et al. Peroral amphotericin B polymer nanoparticles lead to comparable or superior in vivo antifungal activity to that of intravenous Ambisome® or Fungizone™. **PLoS One**. 6(10):25744, 2011.

JEBALI, A. et al. Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation. **Drug Chem Toxicol.**, 37(4):400-9. 2014.

JEBALI, A.; KAZEMI. B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicol In Vitro.**, 27(6):1896-904, 2013.

MAHMOUDVAND, H. et al.: *In Vitro* Study of Leishmanicidal Activity of Biogenic Selenium Nanoparticles against Iranian Isolate of Sensitive and Glucantime-Resistant *Leishmania tropica*. **Iranian J Parasitol**: v. 9, n. 4, pp.452-460, 2014.

MANSUETO, P. et al., Leishmaniasis in travelers: A literature review, **Travel Medicine and Infectious Disease**, xx, 1-19, 2014.

MONTEIRO, L. M. **Sistema Nanoestruturado Polimérico Contendo Hidroximetilnitrofurais: Preparação, Caracterização Físico-Química e Avaliação in vitro da Atividade Leishmanicida Potencial.** Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo, 2013.

PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect.**, 69: 1: S10-8. 2014.

QUINTANA, E. et al. Changes in macrophage membrane properties during early *Leishmania amazonensis* infection differ from those observed during established infection and are partially explained by phagocytosis. **Experimental Parasitology**, 124, 258–264, 2010.

RAHI, A. A. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Leishmania tropica*. **African Journal of Biotechnology**, v. 12(48), p. 6718-6722, 2013.

REMÍGIO HENRIQUES, C.I.; RUIZ, M.A.; ARIAS, J.L. Nanotechnology and the diagnosis/treatment of leishmaniasis. **Ars Pharm.**, 55(3): 01-10, 2014.

ROMERO, A.L., MORILLA, M.J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. **Expert Opin Drug Delivery**. v. 5, p. 805-823, 2008.

ROSSI-BERGMANN, B. et al. Therapeutic potential of biogenic silver nanoparticles in murine cutaneous leishmaniasis. **Journal of NanoResearch**; v. 20, p. 89-97, 2012.

SILVA, D. G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas.** 120 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

SILVA, J. E. G. **Preparação e caracterização de nanopartículas contendo candidato à fármaco anti-leishmania.** TCC (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba. 2016.

SOFLAEI, S. et al. In Vitro Antiparasitic and Apoptotic Effects of Antimony Sulfide Nanoparticles on *Leishmania Infantum*. **J Parasitol Res**, v.2, n.7, p. 1-7, 2012.

SOFLAEI, S. et al. Anti-leishmanial activities of selenium nanoparticles and selenium dioxide on *Leishmania infantum*. **Comp Clin Pathol**, 23: 15, 2014.

STRAZZULLA, A. et al. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. **Biomed Res Int**. 2013:805108, 2013.

TADA, H. et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunol Methods.**, 6; 93(2):157-65, 1986.

TEMPONE, A.G. et al. Targeting *Leishmania chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **J. Antimicro. Chemo.**, 54, 60-68. 2004.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniases.** World Health Organization Technical Report Series. 2010; (949):xii– xiii, 1–186, back cover.

WYREPKOWSKI, C. D. C. **Avaliação anti-leishmania *in vitro* e *in vivo* de *Libidibia ferrea* e estudo de formulações tópicas para o tratamento da forma cutânea da Leishmaniose.** 2016. 199 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

CAPÍTULO IV

TRATAMENTO INTRALESIONAL DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL COM NANOPARTÍCULAS DE ANTIMONIO PENTAVALENTE (NPs Sb⁵⁺)

CAPÍTULO IV

TRATAMENTO INTRALESIONAL DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL COM NANOPARTÍCULAS DE ANTIMONIO PENTAVALENTE (NPs Sb⁵⁺)

Fabiane Veloso Soares^{1,2}, Camila Silva Santos², Bruno Bezerra Jensen^{1,2}, José Fernando Marques Barcellos³, Ana Flávia da Silva Chagas^{2,4}, Gennaro Gentile⁵, Andriy Grafov⁶, Antonia Maria Ramos Franco²

¹Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, Am, Brasil.

²Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Pesquisas em Ambiente, Saúde e Sociedade (CoSAS), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, Am, Brasil.

³Departamento de Morfologia, Laboratório de Histologia Funcional, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, Am, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica (PPGIF), Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, Am, Brasil.

⁵Instituto de Química e Tecnologia de Polímeros (ICTP) – CNR/ Conselho Nacional de Pesquisas, Nápoles, Itália.

⁶Laboratório de Química Inorgânica, Departamento de Química, Universidade de Helsinki. Helsinki, Finlândia.

RESUMO

A leishmaniose cutânea continua sendo uma doença negligenciada com a necessidade de ensaios pré-clínicos em busca de um tratamento seguro e eficaz, pois atualmente não existe um único tratamento para todas as espécies de *Leishmania*. De tal modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) *in vivo* utilizando hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Os animais foram infectados no focinho e agrupados para receber tratamento por 26 dias na área das lesões com NPs Sb⁵⁺ e com Glucantime[®]. Após o tratamento, amostras teciduais foram avaliadas por cultivo, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e histologia. Os resultados mostraram que ao longo do experimento os animais tratados com NPs Sb⁵⁺ (grupos ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b]) apresentaram discreto agravamento das lesões. O tratamento com ETSbL1[b] apresentou resultados promissores. Também foi possível notar através de fotomicrografias a presença das NPs Sb⁵⁺ no interior de macrófagos infectados. No geral, os cortes histológicos de lesão cutânea, fígado, baço e rim apresentaram alterações histopatológicas. Contudo, a amostra ETSbL1[b] (18,6 mg/Sb⁵⁺/kg/dia) apresentou maior eficiência quanto a cura clínica referente a redução no tamanho da lesão e na carga parasitária entre as NPs testadas. Estes resultados sugerem a continuidade deste estudo com novos testes em animais menos suscetíveis a infecção (camundongos) objetivando uma possível cura clínica e parasitológica.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea. *Leishmania amazonensis*. Nanopartículas. Tratamento experimental. Histopatologia.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical causada por parasita intracelular do gênero *Leishmania* (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). É difícil obter números precisos sobre a incidência da doença, pois é provável a subnotificação dos casos, mas estimativas sugerem que há 12 milhões de pessoas infectadas, com 2 milhões de novos casos anualmente (DEN BOER et al., 2011; CDC, 2013; WHO, 2014).

Em humanos, as formas clínicas das leishmanioses são amplamente categorizadas em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC), esta última apresentando um espectro variando de cutânea, mucosa e cutânea difusa (WHO, 2010), caracterizadas principalmente pelo comprometimento do tecido cutâneo e, secundariamente, dependendo da espécie de *Leishmania* e de fatores imunogenéticos do hospedeiro, por lesão do tecido mucoso nasofaríngeo (SILVEIRA et al., 2008; BRASIL, 2017).

A leishmaniose continua sendo uma doença negligenciada, com a necessidade de ensaios pré-clínicos e clínicos, porque ainda não existe um tratamento único e eficaz para todas as espécies de *Leishmania*, além disso, as modalidades de tratamento atuais geralmente não resultam em cura parasitológica (COPELAND; ARONSON, 2015).

Tradicionalmente a terapêutica medicamentosa contra a leishmaniose baseia-se na utilização de diversos agentes ativos, isto é, Antimoniato de Meglumina, Anfotericina B, Pentamidina, Miltefosina e Paromomicina, citando apenas a maioria desses, e sua segurança e eficácia é considerada bastante heterogênea (JEBALI; KAZEMI, 2013; REMÍGIO HENRIQUES; RUIZ; ARIAS, 2014).

Historicamente, o padrão-ouro da terapia sistêmica dessa doença é com antimoniais pentavalentes (MANSUETO et al., 2014), considerado tóxico e ineficaz para alguns isolados de parasitas (JEBALI; KAZEMI, 2013). Apresentam importantes efeitos colaterais, tais como dor no local da injeção, pancreatite, náuseas, vômitos, mialgias, artralgia, plenitude gástrica, pirose, dor abdominal, cefaleia, tontura, palpitação, alterações das enzimas hepáticas, alterações eletrocardiográficas, toxicidade cardíaca e renal, podendo ocorrer morte súbita (CROFT; COOMBS, 2003; SILVA, 2012; BRASIL, 2013; 2017).

Atualmente, não há um tratamento satisfatório para a LC e no Brasil, o tratamento da doença segue as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a realidade das Américas, devendo ser considerada a espécie da *Leishmania infectante* (BRASIL, 2017).

Tratamentos de infecções crônicas devem, idealmente: *i*) ser potente o suficiente para exigir apenas um número limitado ou único de dose; *ii*) apresentar toxicidade mínima, *iii*) e baixo custo e ser fácil de dispensar aos pacientes, e os nanosistemas tem a capacidade inerente para abordar estes requisitos através da melhoria da eficácia dos regimes terapêuticos e, conseqüentemente, da redução dos custos do tratamento (HARTGERS; YAZDANBAKSH, 2006, DNDi, 2016). Dessa forma, os modelos animais, que são altamente diversificados, podem ser usados para avaliar o desenvolvimento de novos medicamentos que ofereçam um tratamento seguro, eficaz e de curto prazo, com um perfil de segurança aceitável (MEARS et al., 2015).

Em um estudo anterior (Capítulo III), nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) foram avaliadas para determinar sua atividade *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* e apresentaram atividade antileishmania, associada a uma baixa toxicidade em macrófagos de linhagem nas menores concentrações. Nesse estudo concluiu-se que as NPs Sb⁵⁺ apresentaram bons resultados levando à possibilidade de serem avaliadas em modelo experimental como tratamento para a LC.

Diante desse cenário, esse estudo teve por objetivo avaliar as NPs Sb⁵⁺ *in vivo* utilizando hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. (L.) amazonensis*, assim como as alterações morfológicas, ultraestruturais e histopatológicas de fragmentos de tecidos celulares dos animais, para investigar o potencial desse nanosistema em uma tentativa de encontrar alternativas de tratamento contra a LC.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos: esse projeto foi submetido para análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais em pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CEUA-INPA), no que diz respeito aos aspectos de natureza ética em experimentação animal, sendo aprovado sob o nº009/2015, com certificado apresentado em Anexo.

A avaliação biológica seguiu as normas do Guia para cuidado e uso de animais de laboratório (<http://www.cobea.org.br>) do Conselho Nacional de Experimentação Animal, e tem por finalidade obter maior número possível de informações relevantes com um pequeno número de animais por grupo, seguindo assim as recomendações dos Comitês de Ética em Experimentação Animal.

Procedência dos Animais: foram utilizados hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), machos, com idade de 90 dias e peso médio de 200g. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), mantidos em condições ambientais controladas (temperatura e umidade), de alimentação *ad libitum* e livre de patógenos, onde também ocorreram as etapas de infecção e tratamento, sob a supervisão do veterinário responsável.

Infecção experimental em hamster (*Mesocricetus auratus*) com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: os animais foram submetidos à infecção por inóculo de 100µL de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária, ajustado a concentração de 10^6 promastigotas/mL, através de seringa estéril, na região do focinho. Os animais infectados foram separados em gaiolas e mantidos no biotério em temperatura e cuidados adequados.

Após 30 dias da infecção, as lesões (histiocitomas leishmanióticos) que surgiram nos animais foram tratadas com quatro séries semanais, cada série consistiu de cinco dias de aplicação intralesional com intervalos de dois dias a cada série de tratamento, conferindo 26 dias de tratamento, sendo realizado acompanhamento quanto ao aspecto macroscópico de evolução das lesões. Após

esse período, foi realizada eutanásia dos animais. Todo esse esquema pode ser observado no cronograma abaixo (Figura 18).

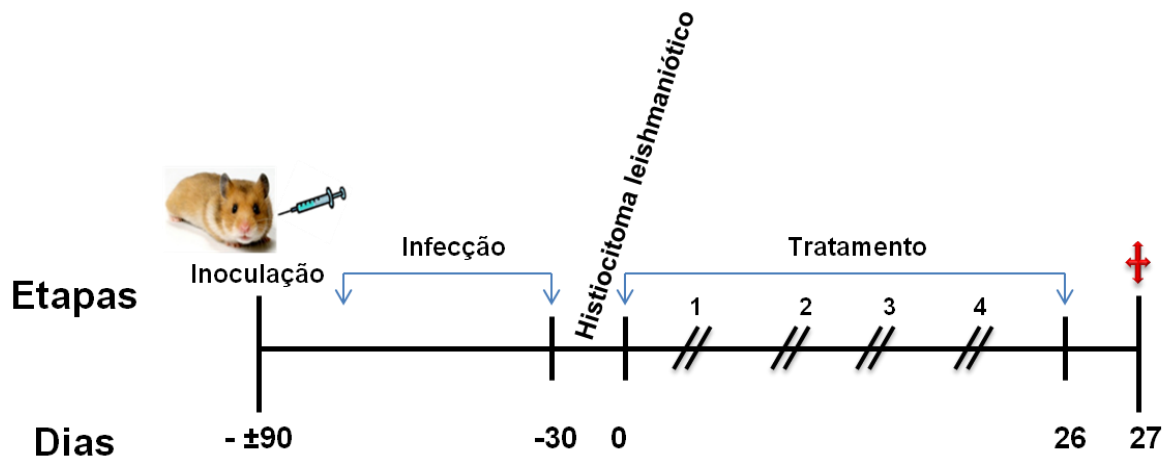


Figura 18 - Cronograma esquemático da experimentação animal. Quatro séries semanais (//) de tratamento com interrupção de dois dias entre cada uma das séries, totalizando 26 dias de tratamento com aplicação intralesional diária de 4,2 mg/Sb⁵⁺/kg/dia de ETSbL1[a], 3,0 mg/Sb⁵⁺/kg/dia de ETSbL2 e 18,6 mg/Sb⁵⁺/kg/dia de ETSbL1[b] no volume final de 0,4 mL.

Delineamento Experimental: o delineamento experimental dos ensaios *in vivo* tem como objetivo verificar a influência dos diferentes tipos de tratamento e o teste estatístico foi baseado em modelo populacional para inferência de diferentes tratamentos.

Neste estudo foram utilizados 35 hamsters, separados por grupos experimentais com cinco animais cada. A seguir a tabela 8 mostra também as concentrações utilizadas e a vias de administração.

Tabela 8 - Grupos experimentais, concentrações de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺) e da droga comercial (Glucantime[®]) testadas e a vias de administração utilizadas.

Grupos experimentais	mg/Sb⁵⁺/Kg/dia	Via de Administração
ETSbL1[a]: animais tratados com NPs Sb ⁵⁺	4,2	IL
ETSbL2: animais tratados com NPs Sb ⁵⁺	3,0	IL
ETSbL1[b]: animais tratados com NPs Sb ⁵⁺	18,6	IL
CIGIm: animais tratados com Glucantime [®]	20	IM
CIGII: animais tratados com Glucantime [®]	20	IL

IL: intralesional; IM: intramuscular.

Outros grupos de animais foram utilizados como controles:

(CCI): animais com infecção, mas sem tratamento;

(CSI): animais sem inoculação com *L. (L.) amazonensis* sem tratamento.

Estes animais foram tratados com 4 séries de cinco dias de aplicações intralesional diárias com NPs Sb⁵⁺ (ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b]), nas concentrações 4,2; 3,0 e 18,6 mg/Sb⁵⁺/kg/dia, respectivamente, com intervalos de dois dias entre cada uma das séries, totalizando 26 dias, e com a droga comercial Glucantime[®], por vias intralesional e intramuscular, na concentração 20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia, com um volume de 0,4 mL.

Na figura 19 é possível compreender a descrição dos procedimentos executados em todo experimento.

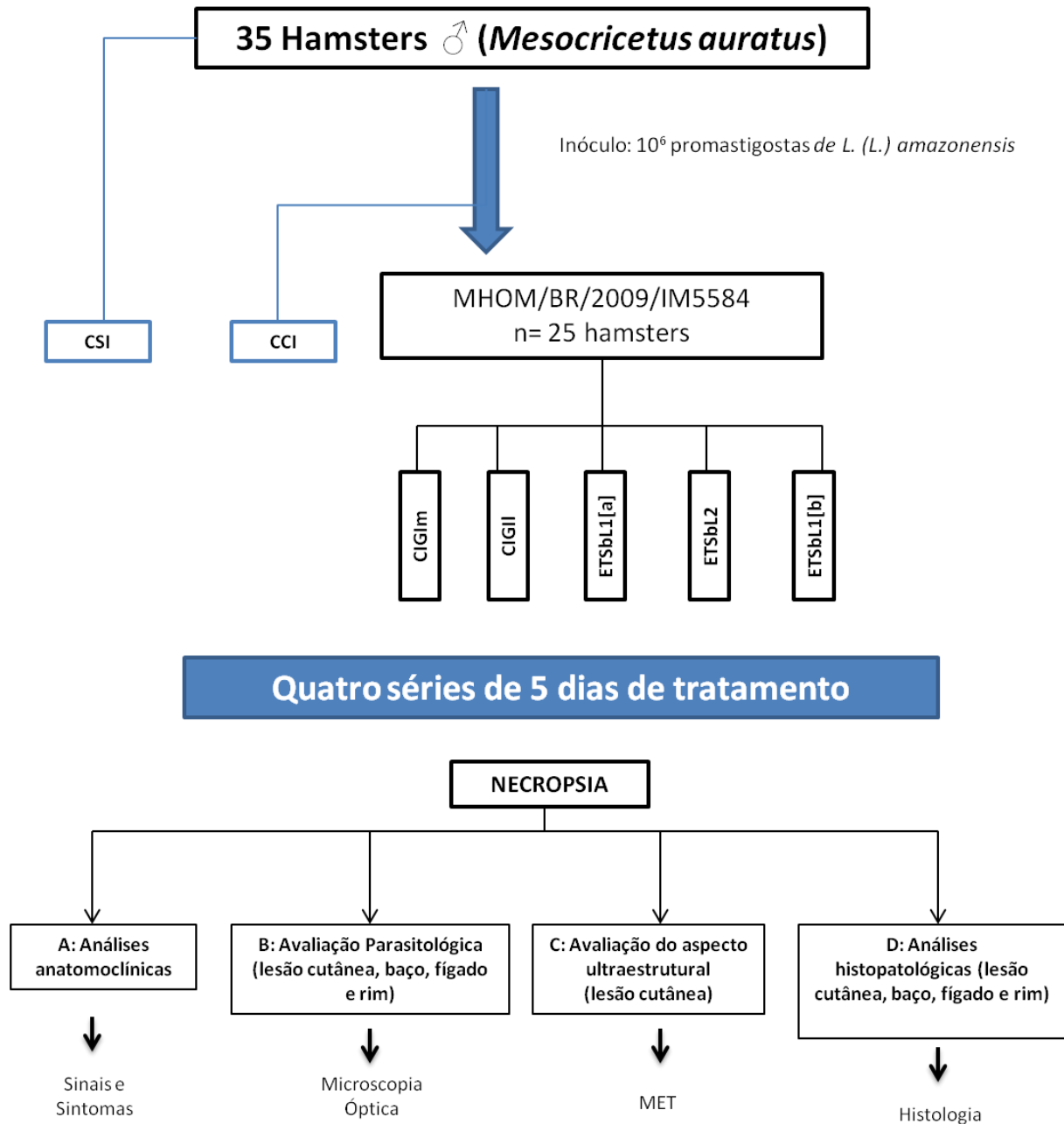


Figura 19 - Fluxograma do delineamento experimental utilizado neste estudo. ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b]: grupos de animais tratados com nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb^{5+}). CIGIm: grupo de animais tratados com Glucantime[®] por via intramuscular, CIGII: grupo de animais tratados com Glucantime[®] por via intralesional, CSI: grupo controle de animais sem inoculação e CCI: grupo controle com animais infectados e não tratados. MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Acompanhamento dos Tratamentos: ao longo do tratamento o estado geral dos animais foi avaliado por meio da observação dos sinais (desidratação, diarreia, alopecia e outros) e sintomas (redução do apetite, alterações de comportamento e outros) que poderiam indicar toxicidade das NPs Sb^{5+} administradas. O peso

corporal dos animais também foi aferido utilizando-se uma balança semi-analítica (Toledo®).

A área total das lesões foi aferida diariamente, registrando-se a evolução do aspecto morfológico das lesões e medindo a extensão com paquímetro digital (Zaas Precision/ Amatools). Todo o procedimento foi fotodocumentado.

Eutanásia dos animais: ao fim do tratamento os animais foram anestesiados (Ketamina® e Xylazina®) e eutanasiados (Pentobarbital sódico – Difenilhidantoína sódica) de acordo com a legislação para uso de animais de experimentação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INPA.

Quantificação e viabilidade parasitária: após a eutanásia dos animais, as lesões foram tricotomizadas e em seguida desinfetadas com várias lavagens com álcool 70%. Após desinfecção, os fragmentos da lesão no eixo vertical foram seccionados com lâmina de bisturi estéril. Amostras de fígado, baço e rim também foram utilizadas. Posteriormente foram transferidos fragmentos teciduais para: solução de criopreservação, solução de glutaraldeído 3,0% em tampão Cacodilato 0,1M (para análise em microscopia eletrônica de transmissão - MET), solução salina estéril para posterior inoculação em tubos com meio bifásico de cultura NNN (NOVY; McNEAL, 1904; NICOLLE, 1908), formol tamponado a 10% (histologia) e para a impressão por aposição em lâmina (*imprint*).

Os tubos de cultura com meio NNN contendo fragmentos teciduais foram incubados em estufa a 25 °C durante 7 dias e após esse período foi investigada a presença de promastigotas viáveis, utilizando microscópio óptico no aumento de 400x. As culturas foram determinadas como negativas quando não foi detectada a presença de parasitas após o período de incubação. Em caso positivo, a concentração de parasitas presentes foi semi-quantificada de acordo com o número logarítmico de células presentes, sendo considerados os valores 1- de 1 até 10 parasitas; 2 - entre 10 a 100 parasitas e 3 – maior que 100 parasitas por campo.

As lâminas contendo impressão por aposição foram fixadas com metanol (P.A) durante cinco minutos e em seguida coradas durante duas horas utilizando o

método de Giemsa. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente e então secas a temperatura ambiente (TA). As lâminas foram analisadas em triplicata em microscopia óptica com aumento de 1000x para verificar a presença de macrófagos infectados e o n° de amastigotas por macrófagos em 100 campos de observação.

Análise Estatística: para os ensaios *in vivo* os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão de cada grupo de tratamento e controles. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism[®] versão 6.0, através da Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste Tukey-Kramer. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das Amostras Teciduais: para avaliar e comparar a ultraestrutura dos tecidos infectados por *L. (L.) amazonensis* após os tratamentos com NPs, a análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de fragmento tecidual (lesão cutânea) foi realizada no Instituto de Química e Tecnologia de Polímeros/ Conselho Nacional de Pesquisas em Nápoles/Itália. O processamento das amostras para MET incluiu as etapas de fixação, pós-fixação, desidratação, infiltração, inclusão, corte, avaliação dos cortes em microscopia de luz e contrastação. Para isso, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 3,0% em tampão Cacodilato de sódio (0,1M; pH 7,12). A etapa de desidratação foi realizada em concentrações crescentes de acetona: 70%, 90%, 95% e 100%, e incluídos em resina Epon 812 (Fluka, Suíça) para posterior corte em ultramicrótomo com obtenção de cortes ultrafinos de 60 nm que foram depositados em tela de Cobre de 250 “mesh”. Estes foram contrastados com Acetato de Uranila (Merk, Alemanha) e Citrato de Chumbo (Merk, Alemanha) (BOZZOLA; RUSSELL, 1998) e analisados em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 109 (ZEISS, Alemanha).

Análise Histopatológica: ao fim do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia e coletada amostra da lesão cutânea, fígado, baço e rim dos animais tratados e dos grupos controle. Em seguida os fragmentos foram transferidos para formol tamponado a 10% (formalina 37-40% 100 mL, cloreto de sódio 9g e água

destilada 900 mL). Após fixação por 24 horas, os fragmentos teciduais foram desidratados em álcool com concentrações crescentes de 70, 85, 95 e 100%. Após desidratação, os tecidos foram diafanizados em três banhos de xilol a 100%, incluídos em parafina (Synth[®]) e seccionados em micrótomo manual. O material foi cortado em secções de espessura de 3-5 µm e dispostos em lâminas histológicas. Foram obtidas 10 lâminas de cortes de cada tecido e de cada animal, e três lâminas foram escolhidas aleatoriamente para coloração com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (TOLOSA et al., 2003), sendo determinadas as alterações degenerativas, inflamatórias, hiperêmicas, sendo o infiltrado inflamatório mensurado segundo Solano-Gallego et al. (2004) em cruces, como a seguir;

(-) sem infiltrado inflamatório;

(+) foco isolado de células inflamatórias;

(++) áreas de infiltrado inflamatório, isolados ou coalescentes;

(+++) áreas de infiltrado inflamatório difuso.

A confecção e leitura das lâminas histológicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Morfologia da UFAM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

É necessário atentar para a diversidade de modelos animais rotineiramente utilizados para testes com as diversas espécies de *Leishmania*, porém é fato que não há um modelo validado para ensaios contra a LC. O uso do *Mesocricetus auratus* neste estudo é justificado pela alta suscetibilidade que essa espécie apresenta a patologias dermatópicas (GOTO; LINDOSO, 2004; DEA-AYUELA et al., 2007). Entretanto, assim como em outros modelos experimentais, sabe-se que ocorrem variações quanto à carga parasitária marcada pela individualidade da relação parasita-hospedeiro (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004) e fatores como variações quanto à virulência da espécie parasitária, resistência, resposta imune, entre outros.

A atividade *in vivo* das NPs Sb⁵⁺ foi avaliada após a confirmação da presença do nódulo dérmico (histiocitoma leishmaniótico) no focinho dos hamsters infectados por *L. (L.) amazonensis* (Figura 20).



Figura 20- Nódulo dérmico (histiocitoma leishmaniótico) [seta] no focinho do animal, 30 dias após inoculação com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

- **A: Análise anatomoclínica dos animais tratados:** A evolução clínica da lesão é um parâmetro importante na Leishmaniose Cutânea. O Ministério da Saúde define como cura da LC quando se tem a “reepitelização das lesões quando ulceradas, e a regressão total da infiltração e eritema” (BRASIL, 2017).

Nesse estudo a evolução das lesões foi monitorada diariamente. Não foram observadas infecções secundárias sobre as lesões por simples inspeção macroscópica ao longo do experimento.

No início do tratamento todos os animais apresentaram lesões nodulares, de aspecto volumoso e diâmetro uniforme. Ao longo do experimento os grupos de animais tratados com NPs Sb⁵⁺ apresentaram discreto agravamento das lesões, apresentando edema, eritema e/ou descamação (grupos ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b]), observadas a partir do 8º dia de tratamento [Figura 21].

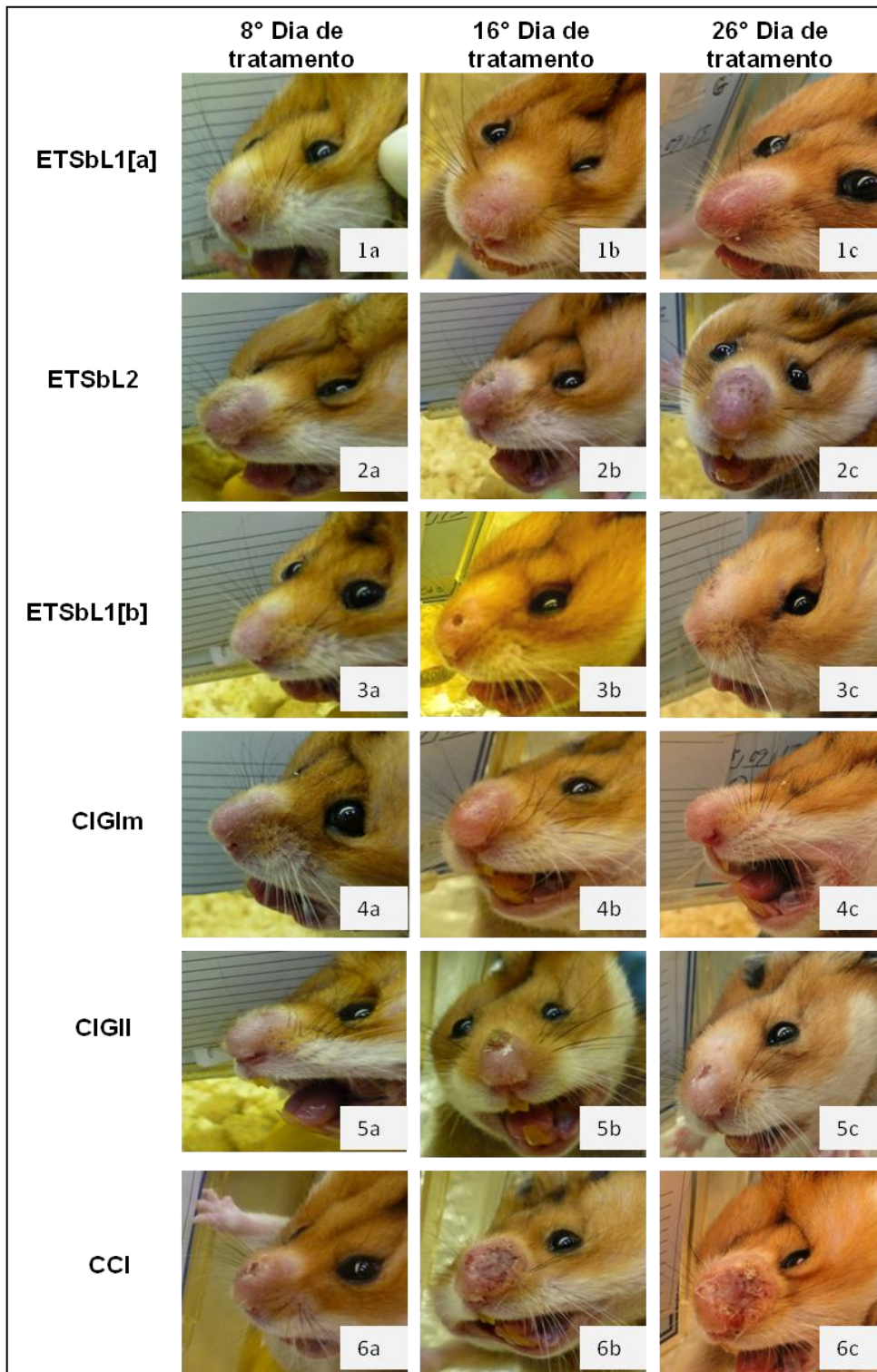


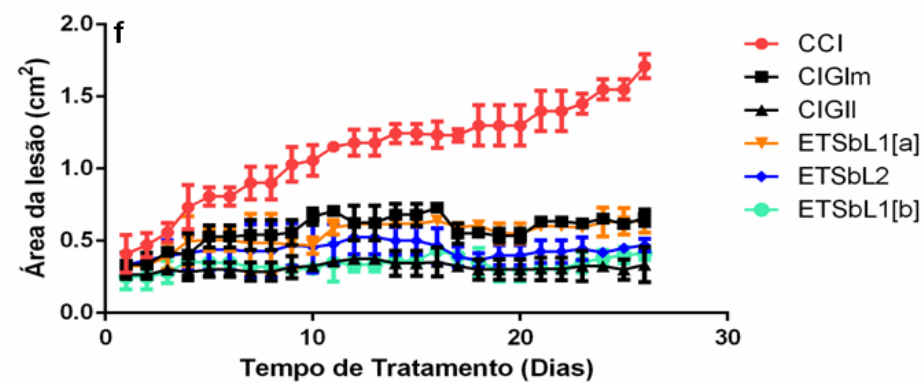
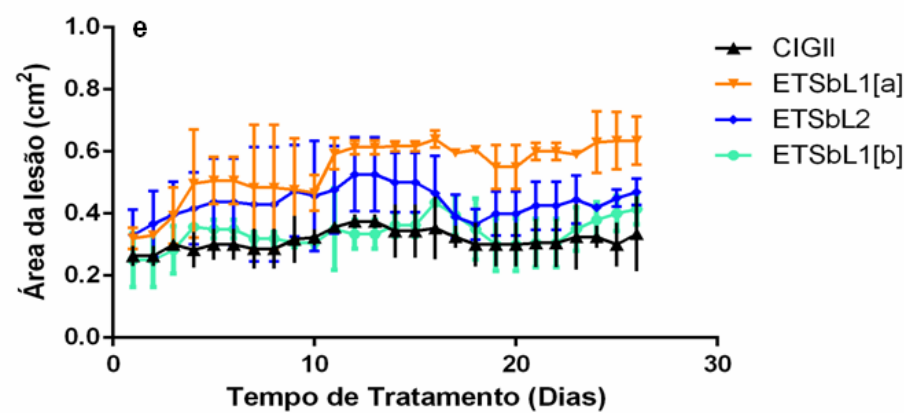
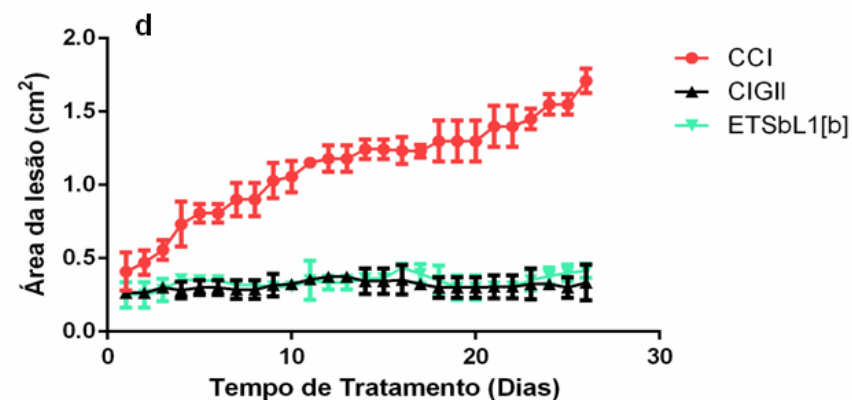
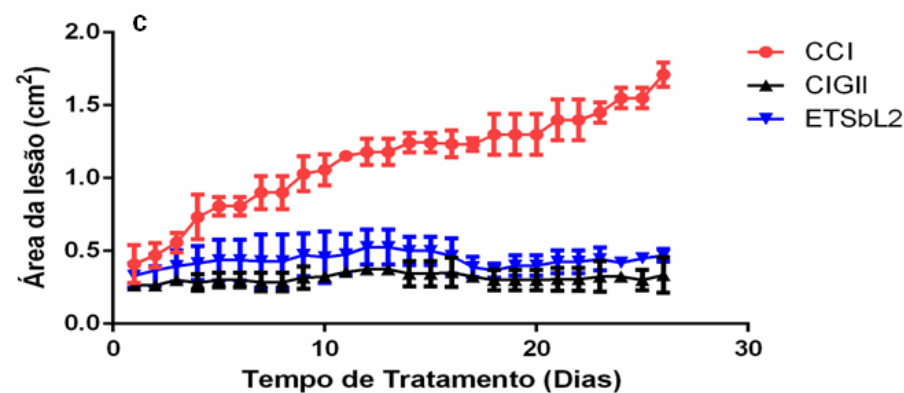
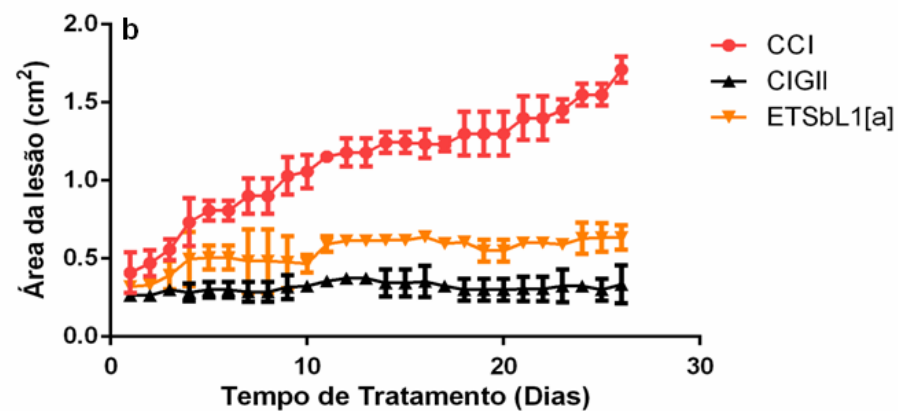
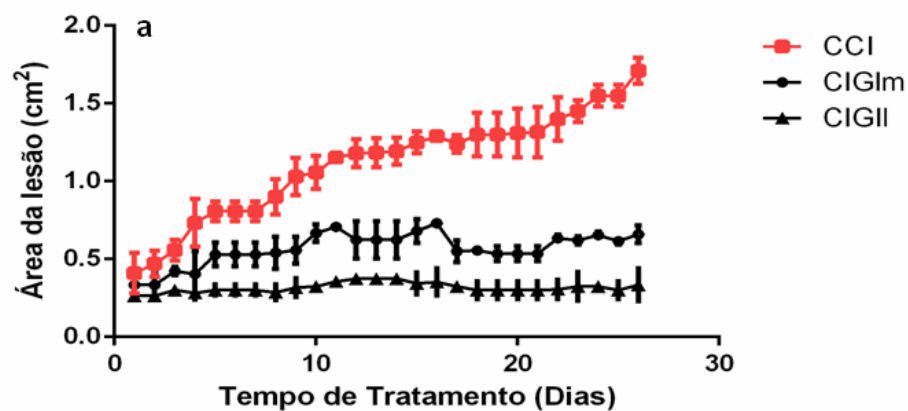
Figura 21- Evolução clínica das lesões cutâneas em *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratados por 26 dias. ETSbL1[a]: grupo de animais tratados com NPs Sb^{5+} (4,2 mg/ Sb^{5+} /kg/dia); ETSbL2: grupo de animais tratados com NPs Sb^{5+} (3,0 mg/ Sb^{5+} /kg/dia); ETSbL1[b]: grupo de animais tratados com NPs Sb^{5+} (18,6 mg/ Sb^{5+} /kg/dia); CIGIm: grupo de animais tratados com Glucantime® (20 mg/ Sb^{5+} /kg/dia) por via intramuscular; CIGII: grupo de animais tratados com Glucantime® (20 mg/ Sb^{5+} /kg/dia) por via intralesional e CCI: grupo de animais infectados e não tratados.

Os animais dos grupos tratados com Glucantime[®] (CIGII e CIGIm) apresentaram lesões cutâneas nodulares durante todo o tratamento (Figura 21, 4 a-c e 5 a-c) e as lesões de animais do grupo controle com infecção (CCI), ou seja, aqueles que apresentavam infecção, mas não foram tratados, apresentaram um aumento de 12 vezes da área lesionada ao final do tratamento, uma vez que exibiram ulcerações sem bordas definidas, intenso edema, eritema e aparecimento de crosta, como demonstrado na figura 21-6c.

Sinais clínicos de toxicidade não foram identificados durante o tratamento nos animais, uma vez que apresentavam aspecto saudável, com mobilidade e vitalidade preservadas. Além disso, o percentual de letalidade foi nulo durante os 26 dias de tratamento. Dados similares foram encontrados por Ribeiro et al. (2014) ao descrever que nenhuma alteração clínica e nenhum óbito foi observado em camundongos tratados com nanopartículas de Anfotericina B (NQC-AmpB).

Quanto ao efeito do tratamento com NPs Sb⁵⁺ no tamanho da lesão, todos os animais infectados tiveram as lesões mensuradas diariamente e os dados registrados para a avaliação da significância estatística da área da lesão. Na figura 22 é possível observar a evolução clínica das lesões cutâneas durante o período de tratamento.

Figura 22- Evolução clínica da área das lesões cutâneas em *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* durante o tratamento. ETSbL1[a]: grupo de animais tratados com NPs Sb⁵⁺ (4,20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia), ETSbL2: grupo de animais tratados com NPs Sb⁵⁺ (3,0 mg/Sb⁵⁺/kg/dia), ETSbL1[b]: grupo de animais tratados com NPs Sb⁵⁺ (18,6 mg/Sb⁵⁺/kg/dia). CIGIm: grupo de animais tratados com Glucantime[®] (20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia) por via intramuscular, CIGII: grupo de animais tratados com Glucantime[®] (20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia) por via intralesional e CCI: grupo controle com animais infectados e não tratados. Dados expressos como média e desvio padrão.



As observações dos dados apresentados na figura 22, revelam que os animais do grupo tratado com Glucantime[®] por via intramuscular (CIGIm) apresentaram um aumento no tamanho da lesão nos primeiros nove dias, seguido por decréscimo e estabilidade até o final do tratamento. Já o grupo tratado com Glucantime[®] por via intralesional (CIGII) não apresentou aumento da lesão com o tempo de tratamento e permaneceu assim até o final do experimento (Figura 22a). Quando comparados com o grupo controle de animais infectados e sem tratamento (CCI) os resultados são estatisticamente significativos ($p < 0,0001$). Esses dados são confirmados pela literatura que apresenta uma diminuição no tamanho da lesão com o passar do tempo no grupo tratado com Glucantime[®] (RODRIGUES, 2007; ALMEIDA, 2012).

Fato interessante é que neste estudo esperava-se a cura clínica dos animais tratados com Glucantime[®], pois é a droga preconizada para o tratamento da leishmaniose cutânea pela Organização Mundial da Saúde/Ministério da Saúde, mas como podemos observar na figura 21 (5c e 6c) as lesões continuaram ativas até o final do experimento, pelo período estudado. No entanto, deve-se levar em conta a alta suscetibilidade desta espécie animal a infecção por *Leishmania* e o protocolo/tempo de tratamento utilizado.

Ao analisar os resultados dos grupos tratados com NPs Sb⁵⁺, é possível observar que o grupo ETSbL1[a] exibiu aumento da lesão entre o primeiro e o 15º dia de experimento e após este período, as lesões começam a estabilizar com a continuidade do tratamento (Figura 22b). Ocorreu diminuição gradativa da lesão a partir do décimo dia de experimento com a continuidade do tratamento no grupo tratado com ETSbL2 (Figura 22c). Os animais tratados com ETSbL1[b] mostraram tamanho de lesão sem diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado com o controle positivo tratado com Glucantime[®] por via intralesional (Figura 22d).

Assim, é possível observar que os grupos tratados com as NPs Sb⁵⁺ por via intralesional tiveram respostas semelhantes quando comparados à terapêutica com Glucantime[®] também por via intralesional (CIGII) com diferença estatística significativa quando comparados ($p < 0,0001$) [Figura 22e], embora o tamanho da lesão não seja estatisticamente significativo quando comparado os tratamentos entre si ($p > 0,05$). Quanto ao aspecto macroscópico da lesão cutânea dos animais tratados com as NPs Sb⁵⁺ (ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b]) exibiu edema, eritema e

descamação, e os tratados com Glucantime[®] por via intralesional (CIGII) além dessas características também apresentou aspecto nodular.

No estudo de Beheshtiet al. (2013) foram analisadas nanopartículas de selênio (NPsSe) em camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) major* e observaram que houve atraso no desenvolvimento das lesões cutâneas localizadas. Igualmente estudando o efeito de NPs em camundongos Balb/c, mas contra *L. (L.) amazonensis*, Ribeiro et al. (2014) avaliaram nanopartículas de Anfotericina B (NQC-AmpB) contendo moléculas de quitosano e sulfato de condroitina e descreveram que em comparação com os grupos controle, os animais tratados com NQC-AmpB apresentaram reduções significativas no tamanho da lesão e que isso foi sustentado até 30 dias após o tratamento.

Contrariando os dados acima, os achados de Carvalho (2011) demonstram que camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com complexo Anfotericina B associada às nanonestruturas de ácido láctico e glicólico (PLGA)[D-anfoB-nano] não apresentou diferença significativa no tamanho da lesão, pois não exibiu redução em comparação ao tamanho das lesões antes do tratamento.

Moreno et al. (2015) propuseram o carregamento de β -lapachona (β -LP) em NPs de lecitina-quitosana para direcionar o fármaco para a derme quando aplicado topicamente em camundongos Balb/c infectados por *L. (L.) major* e assim promover a cicatrização das lesões, no entanto, as NPs β -LP não influenciaram a atividade antileishmania do fármaco, uma vez que não obteve redução de parasitas, mas pararam a progressão da lesão.

Torabi et al. (2012) estudaram o efeito das nanopartículas de ouro (NPs Au) no tratamento da LC induzido por *L. (L.) major* em camundongos Balb/c e notaram que o tamanho médio das lesões diminuiu 4 semanas após o tratamento, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa em 8 semanas ($p=0,061$). As NPs Au são bastante estudadas por apresentam aspectos importantes, como suas propriedades empregadas em dispositivos biomédicos, em particular no tratamento de câncer por terapia fototérmica (KURO et al., 2012; CHEN et al., 2015; TEIXEIRA, 2016).

Outras NPs de grande importância são as de prata (NPs Ag), já que possuem efeitos antimicrobianos comprovados (DARROUDI et al., 2009; KVITEK et al., 2011)

e alguns estudos até tamanho médio das lesões diminuiu 4 semanas após o tratamento relatam a atividade antileishmania (KHOSRAVI et al., 2011; MAYELIFAR et al., 2015) juntamente com a radiação ultravioleta B (UV_B) como fator inibitório do crescimento parasitário, como descrevem Ameneh et al. (2013) e Mayelifar et al. (2015) em camundongos Balb/c infectados por *L. (L.) major*. Os resultados mostraram que a administração simultânea de NPs Ag e UV_B proporcionou diferenças significativas na área relativa das lesões em comparação com o grupo controle.

Vale a pena reforçar o quanto seria interessante utilizar as NPs Sb⁵⁺ acompanhadas por um período de tratamento maior nas infecções em hamsters e em outras espécies de animais, para averiguar a completa cicatrização/reepitalização, avaliando a viabilidade parasitária em tempo mais prolongado.

- Avaliação ponderal dos animais tratados

Devido ao emprego de ligantes orgânicos como revestimentos das NPs Sb⁵⁺, bem como a toxicidade sistêmica das NPs foi verificada a possibilidade de influência dessas NPs no peso dos animais como mostra a figura 23, já que Robledo et al. (2012) relatam que a infecção por *L. (L.) amazonensis* não afeta o peso corporal de hamsters (*Mesocricetus auratus*).

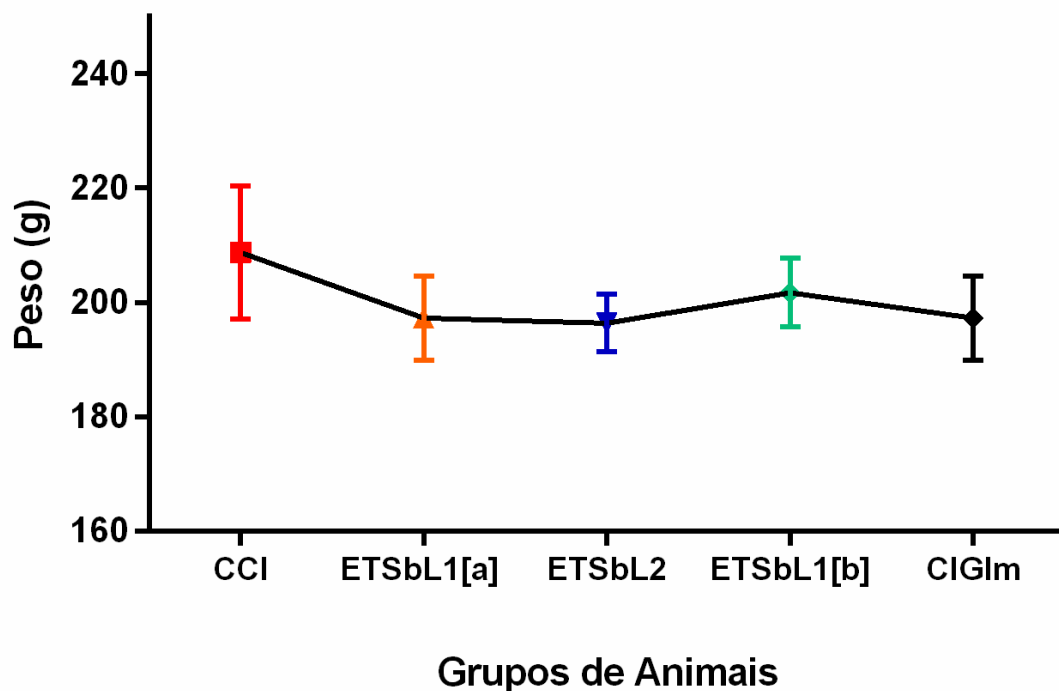


Figura 23- Avaliação ponderal dos hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratados com nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb^{5+}) (ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b]) em comparação com o grupo controle de animais infectados e não tratados (CCI).

O resultado acima demonstra que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) na evolução ponderal entre os grupos de animais tratados, sugerindo que as NPs Sb^{5+} não alteram o ganho de peso dos animais. Esses dados são similares aos encontrados na literatura.

- B: Análise parasitária dos fragmentos teciduais dos animais

A fim de verificar a carga parasitária após os tratamentos com os NPs Sb^{5+} , impressões de fragmentos de lesão cutânea em lâmina foram analisados em microscopia óptica e observou-se a presença de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* internalizadas em macrófagos, além de inúmeras amastigotas extracelulares em todos os grupos de animais tratados, apesar de valores quantitativos variáveis (Figura 24).

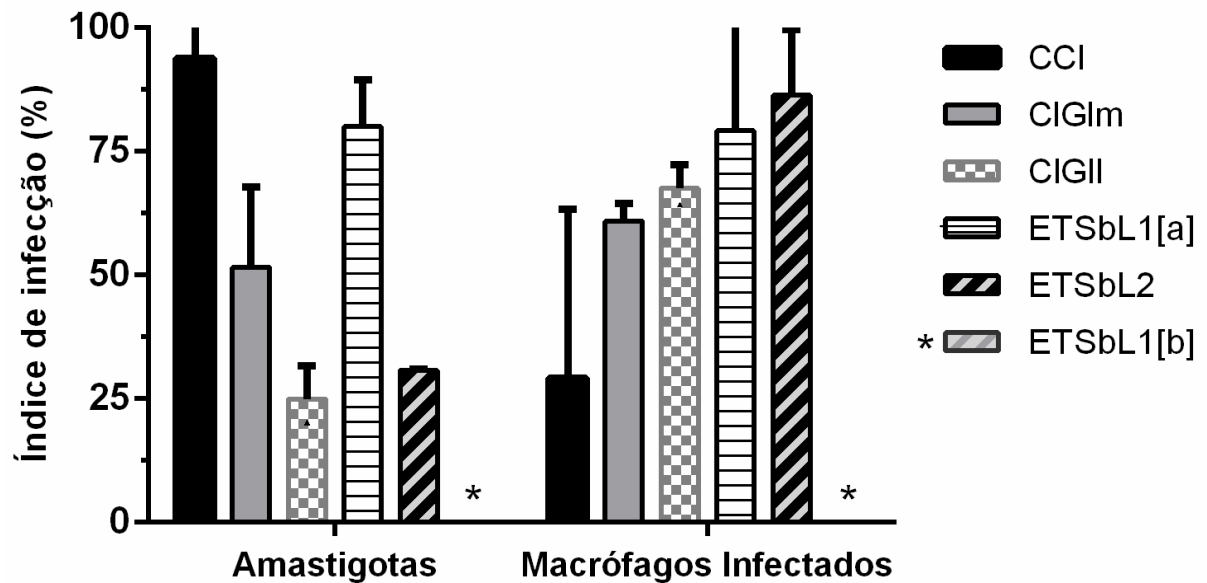


Figura 24 - Percentual médio do número de amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e macrófagos infectados após impressão em lâmina de fragmentos de lesão cutânea dos grupos tratados com nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺): ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b]. CIGIm: grupo de animais tratados com Glucantime[®] por via intramuscular, CIGII: grupo de animais tratados com Glucantime[®] por via intralesional e CCI: grupo controle com animais infectados e não tratados. Lâminas coradas com Giemsa e contadas em aumento de 1000X. *tendência à cura clínica/parasitária.

Esses dados comprovam a diferença estatística entre os tratamentos com Glucantime[®] (CIGIm e CIGII) e com ETSbL2 quando comparados os valores percentuais de amastigotas no grupo controle ($p < 0,001$). Nota-se que houve diminuição da carga parasitária no tratamento com Glucantime[®] (CIGII), resultado condizente com a literatura (RODRIGUES, 2007; ALMEIDA, 2012) e com ETSbL2, ambos por via intralesional.

O estudo de Torabi et al. (2012) relata o efeito de nanopartículas de ouro (NPs Au) no tratamento da LC induzido por *L. (L.) major* em camundongos Balb/c com diminuição significativa no número de amastigotas da lesão em comparação com o grupo controle.

De maneira interessante, o tratamento com ETSbL1[b] mostrou apenas duas amastigotas livres nos 100 campos observados em triplicata, apresentando perfil com tendência à cura clínica/parasitária. Vale ressaltar que quando comparamos as concentrações de antimônio pentavalente presente em ambas as formulações, a dose dessa amostra possui concentração de 18,6 mg/Sb⁵⁺/Kg/dia e a do

Glucantime[®] possui 20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia, ou seja concentrações próximas, sugerindo aumento da atividade leishmanicida das NPs Sb⁵⁺.

Quanto à média percentual de macrófagos infectados não foram constatadas diferenças estatísticas para nenhum grupo tratado. Nota-se que o grupo ETSbL1[b] (*) também apresentou tendência à cura clínica/parasitária (Figura 24).

A fim de averiguar a viabilidade parasitária, os fragmentos teciduais dos animais dos grupos tratados e controle foram semeados em meio de cultura NNN e após cultivo por 7 dias constatou-se a presença de promastigotas viáveis de *L. (L.) amazonensis* apenas nos fragmentos de lesão cutânea dos animais provenientes de todos os tratamentos como demonstrado na figura 25.

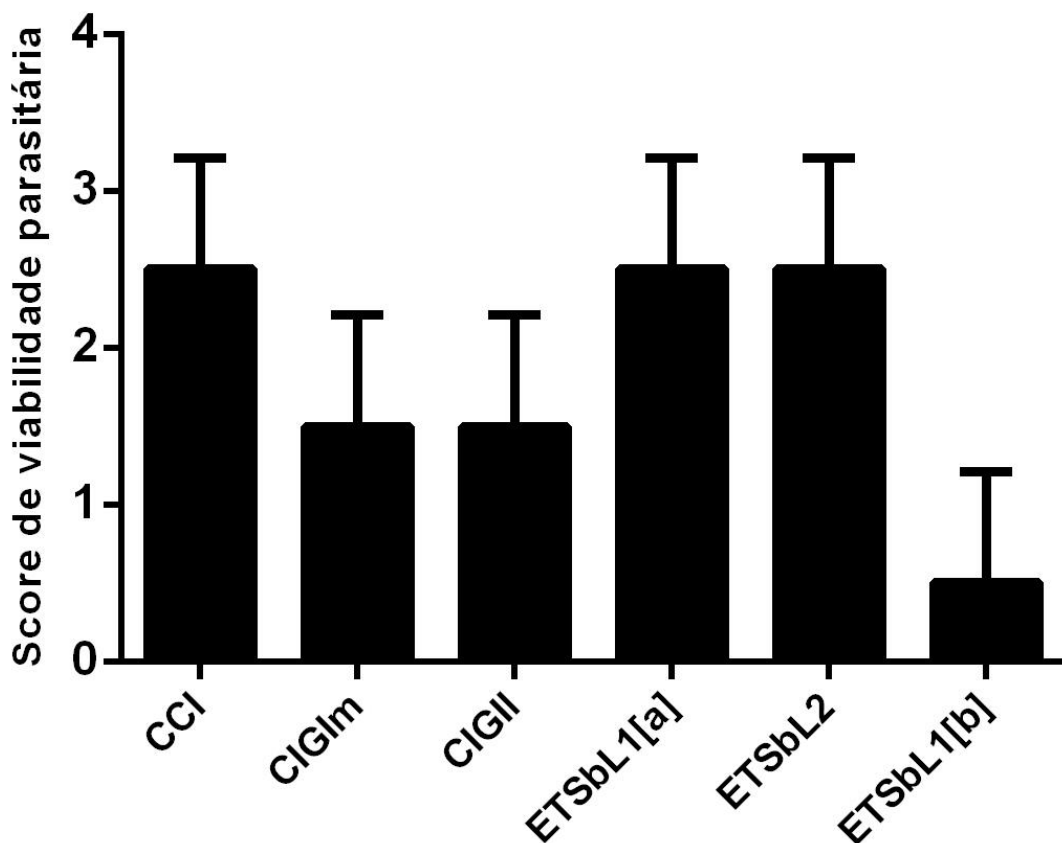


Figura 25 - Scores de parasitas viáveis visualizados em cultura Novy-McNeal-Nicolle (NNN) após sete dias de incubação a 25° C provenientes de fragmentos de lesões cutâneas de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* dos grupos experimentais. Grupos tratados com nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺): ETSbL1[a], ETSbL2 e ETSbL1[b] CIGIm: grupo de animais tratados com Glucantime[®] por via intramuscular, CIGII: grupo de animais tratados com Glucantime[®] por via intralesional e CCI: grupo controle com animais infectados e não tratados. Considera-se 0= ausência; 1= 1 a 10 parasitas/campo; 2= 10 a 100 parasitas/campo e 3 >= 100 parasitas/campo.

A contagem foi semi-quantitativa e os resultados apresentados na figura 25 revelam a presença de promastigotas viáveis nas culturas do grupo tratados com Glucantime[®] tanto por via IM como por IL (CIGIm e CIGII) apresentando *scores* semelhantes (*score* < 2) não havendo diferenças estatísticas entre eles ($p > 0,05$). Já os grupos de animais tratados com ETSbL1[a] e ETSbL2 apresentaram *score* > 2, dado semelhante ao grupo controle com animais infectados e não tratados (CCI).

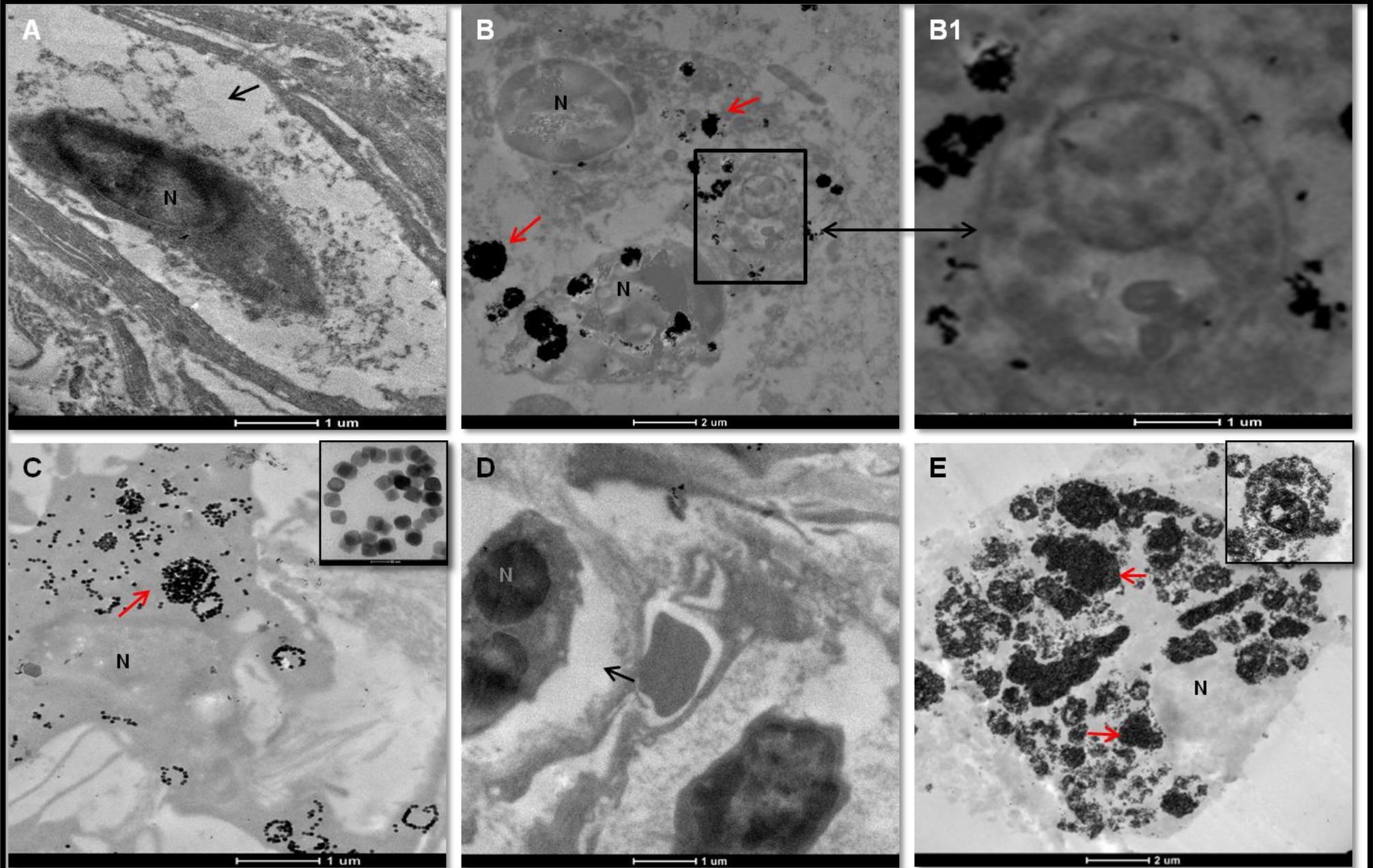
Os animais do grupo tratado com ETSbL1[b] diferem dos demais, pois apresentou *score* < 1 ($p < 0,001$), e ao correlacionar os resultados apresentados nas figuras 24 e 25 nota-se que houve expressiva redução da carga parasitária, diferindo do tratamento com a droga convencional.

No estudo de Ribeiro et al. (2014) nanopartículas de anfotericina B (NQC-AmpB) foram avaliadas em camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e apresentou redução da carga de parasitas das lesões quando comparadas ao grupo controle. A Anfotericina B é um antibiótico antifúngico utilizado no tratamento das leishmanioses. O uso clínico dessa droga é recomendado para os casos graves de leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional, sendo bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004; GOTO; LINDOSO, 2010; SINGH et al., 2016).

- C: Análise ultraestrutural dos fragmentos de lesão cutânea

Com o intuito de verificar as possíveis alterações devido ao alvo de ação das NPs, foi realizada análise ultraestrutural de fragmentos de lesão cutânea dos animais tratados por 26 dias com NPs Sb⁵⁺, processados por MET e confirmou-se a presença de macrófagos com vacúolo parasitóforo, amastigotas intracelulares e NPs internalizadas no citoplasma das células hospedeiras (Figura 26).

Figura 26 - Imagens ultraestruturais de macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tratados com nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb^{5+}) e observadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). (A) Tratamento com Glucantime[®] por via intramuscular (CIGIm). Nota-se a presença de vacúolo parasitóforo e restos celulares (seta preta). (B) Tratamento com ETSbL1[a]. Observa-se presença de NPs Sb^{5+} intracitoplasmática (seta vermelha) e amastigota preservada (retângulo). (B1) Amastigota preservada, após tratamento com ETSbL1[a]. (C) Tratamento com ETSbL2. Nota-se a presença de NPs Sb^{5+} intracitoplasmática (seta vermelha); destaque na foto para a conformação de NPs em círculo. (D) Tratamento com ETSbL2. Nota-se amastigota preservada e vacúolo parasitóforo (seta preta). (E) Tratamento com ETSbL1[b]. Observa-se presença de inúmeras NPs Sb^{5+} intracitoplasmática (setas vermelha) e amastigota delimitada por NPs Sb^{5+} (em destaque na foto). (N) núcleo. Barras: 1 e 2 μm também nas fotos em destaque.



A fotomicrografia 26A mostra macrófago de animal tratado com a droga comercial Glucantime[®] por via intramuscular (CIGIm), apresentando núcleo bem delimitado, intensa vacuolização citoplasmática e restos celulares, indicando o possível processo de destruição do parasita.

É evidente que as NPs Sb^{5+} foram transportadas ao interior das células, alcançando tanto os macrófagos como as amastigotas, sugerindo retenção de antimônio como mostra as fotomicrografias 26B, C e E (seta vermelha). E apesar de ser empregado há muitos anos no tratamento das leishmanioses o mecanismo de ação dos antimoniais não está completamente esclarecido, mas estudiosos sugerem que para exercer a atividade leishmanicida é necessária à redução de pentavente (Sb^{5+}) para trivalente (Sb^{3+}) [WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004; DEMICHELII; FRÉZARD, 2005], e que somente as formas amastigotas são capazes dessa redução (SHAKED-MISHAN et al., 2001); ou ainda que essa redução também ocorra no macrófago (SERENO et al., 1998).

Em via de regras, verificou-se que após o tratamento experimental com as NPs Sb^{5+} o núcleo das células hospedeiras permaneceu preservado, com envoltório nuclear bem delimitado (Fotomicrografias 26B, C e E). De modo interessante, foi possível encontrar amastigota intracitoplasmática preservada no tratamento com ETSbL1[a], exibindo morfológico mum com o que é descrito na literatura científica, apresentando formato oval e membrana plasmática delimitada, núcleo grande, arredondado e íntegro facilmente indentificáveis, sem desorganização do corpo celular e citoplasma contendo organelas celulares (Fotomicrografias 26B e B1) [REY, 2001].

Os macrófagos presentes na lesão cutânea dos animais tratados com ETSbL2 exibiram vacúolos citoplasmáticos e as NPs Sb^{5+} apresentaram uma conformação circular, com interior de aspecto vazio (Fotomicrografia 26C). Da mesma forma, observou-se amastigota inserida em vacúolo parasitóforo, apresentando mudança morfológica na membrana plasmática, mas o núcleo com formato arredondado e citoplasma aparentemente vazio (Fotomicrografia 26D, seta preta), indicando processo de destruição no interior do vacúolo.

Após o tratamento com ETSbL1[b], apesar de a célula hospedeira não ter sofrido nenhuma alteração morfológica aparente, pois ainda apresenta membrana

com superfície irregular e núcleo oval (Fotomicrografia 26E), as amastigotas apresentam-se interiorizadas nos vacúolos parasitóforos e cercadas por NPs, mostrando processo de degradação celular, com alteração do formato celular oval e dano nuclear, sugerindo à destruição dos parasitas no interior dos vacúolos (Fotomicrografia 26E, foto em destaque).

Para tentar esclarecer esses dados, buscou-se alguns estudos que relatam a absorção no nível celular dos nanomateriais nos organismos-receptores. Estes apontam duas principais rotas de entrada: quando as NPs alcançam as células, estas podem ser absorvidas através da membrana celular por diversos processos, como a endocitose, que consiste na invaginação da parede celular sobre a partícula até englobá-la totalmente (AUFFAN et al., 2006; YEHA et al., 2007) ou por outro processo que consiste na entrada destas partículas através de organelas denominadas de caveolae ("pequenas cavernas"), as quais são uma série de lipídeos especializados na função de transportar partículas, sendo um dos mecanismos utilizados por vírus, de dimensões nanométricas, para adentrarem nas células (SHIN; ABRAHAM, 2001; CHEN et al., 2005; WANG, 2014; CHENG; NICHOLS, 2016).

Quando se trata do uso de NPs em sistemas biológicos uma característica fundamental é tamanho médio das NPs e as características da superfície, pois influenciará diretamente sobre as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas como o tempo de permanência no organismo, a velocidade em que atravessam as barreiras e o seu reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear (BERRY; CURTIS, 2003; ZHANG et al., 2010; RANGHAR et al., 2014).

- D: Análise histopatológica dos fragmentos teciduais

Ainda para compreender os efeitos das NPs Sb^{5+} *in vivo* foi realizada a avaliação da reação inflamatória nos fragmentos teciduais dos animais tratados após 26 dias.

Estudos sobre a distribuição biológica de NPs demonstram a presença delas em diversos órgãos do corpo (KIM et al., 2006; FOLDBJERG et al., 2009). Assim,

neste estudo além da pele (lesão cutânea), os órgãos selecionados foram fígado, baço e rim, devido sua grande importância no metabolismo sistêmico. A seguir as figuras 27, 28, 29, 30 e 31 exibirão as fotomicrografias de cada grupo de animal acompanhado e tratado.

A figura 27 mostra cortes histológicos dos diversos órgãos dos animais do grupo controle sem inoculação por *L. (L) amazonensis* (CSI), e nota-se a preservação da arquitetura dos tecidos.

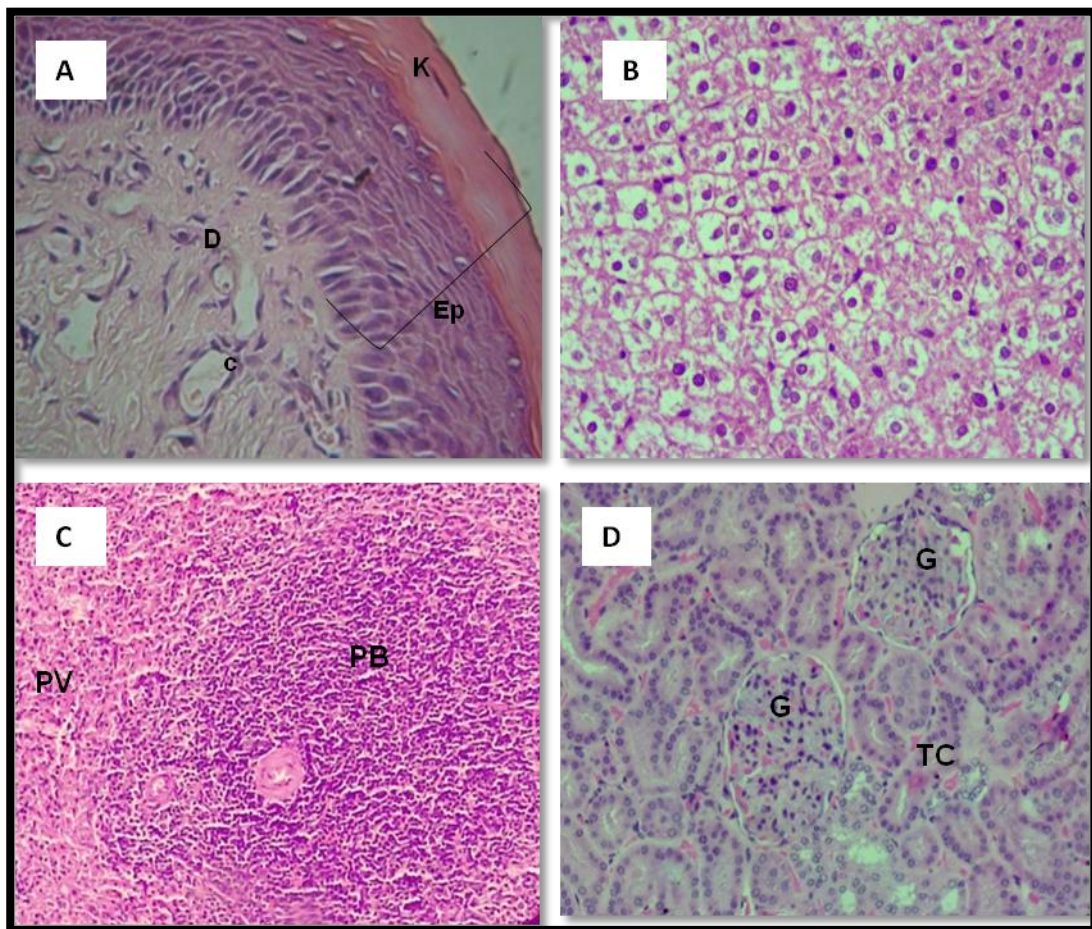


Figura 27 - Fotomicrografia de cortes histológicos de pele, fígado, baço e rim de hamsters sem inoculação por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A- Pele: K – queratina (estrato córneo evidente), Ep – Epiderme e D - derme e c – capilares, 8x. B- Fígado: hepatócitos e sinusóides preservados, 40x. C- Baço: áreas de Polpa Vermelha (PV) e Polpa Branca (PB), 40x. D- Rim: túbulos contorcidos (TC) e glomérulos renais (G) preservados, 40x.

A fotomicrografia 27A apresenta preservação da arquitetura da epiderme e derme dos animais sem infiltrado inflamatório e alteração histológica.

O fígado dos animais mostrou hepatócitos, células de kupffer e sinusóides preservados (Fotomicrografia 27B). O baço apresenta arquitetura esplênica preservada (Fotomicrografia 27C). A fotomicrografia 27D confirma a preservação da arquitetura dos túbulos e glomérulos renais.

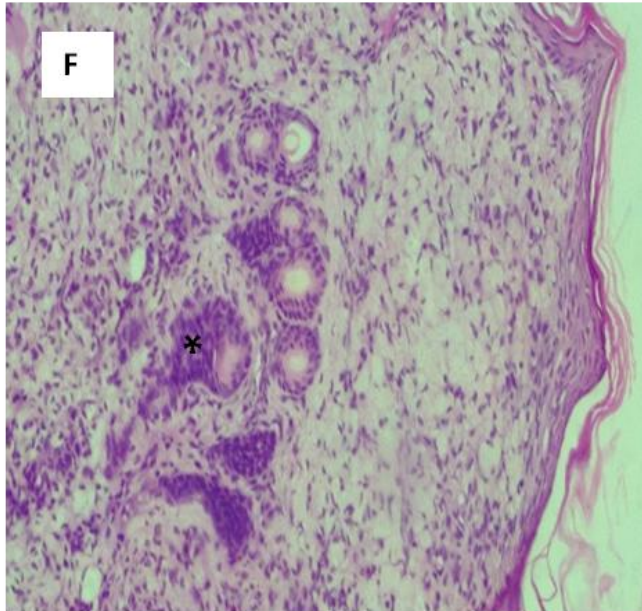
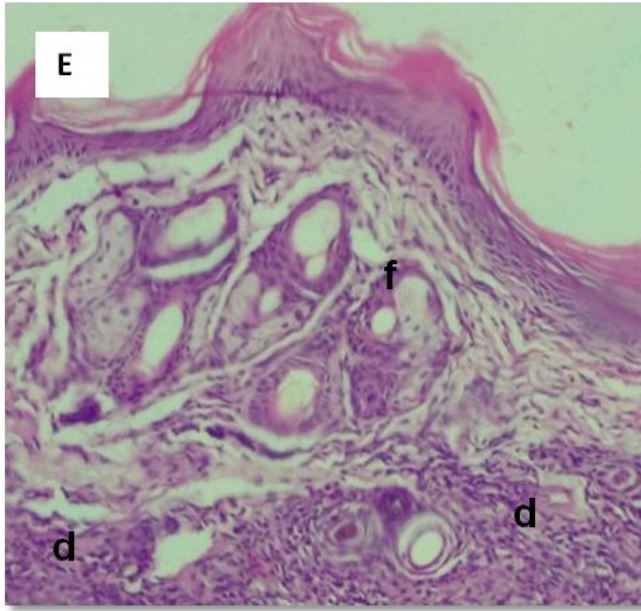
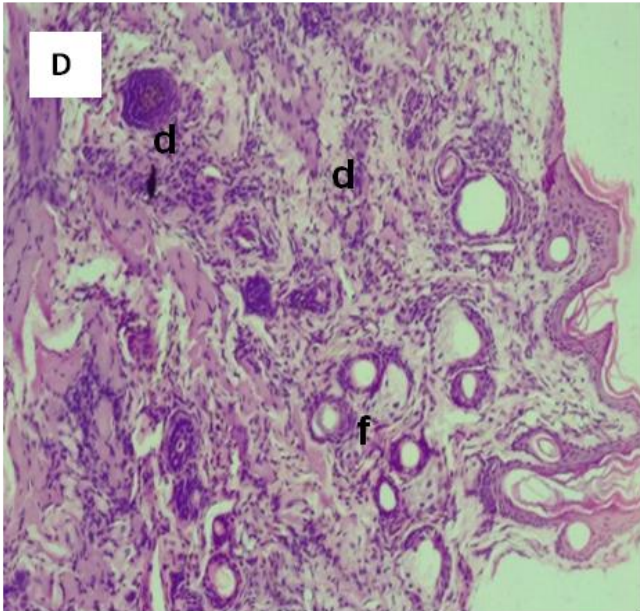
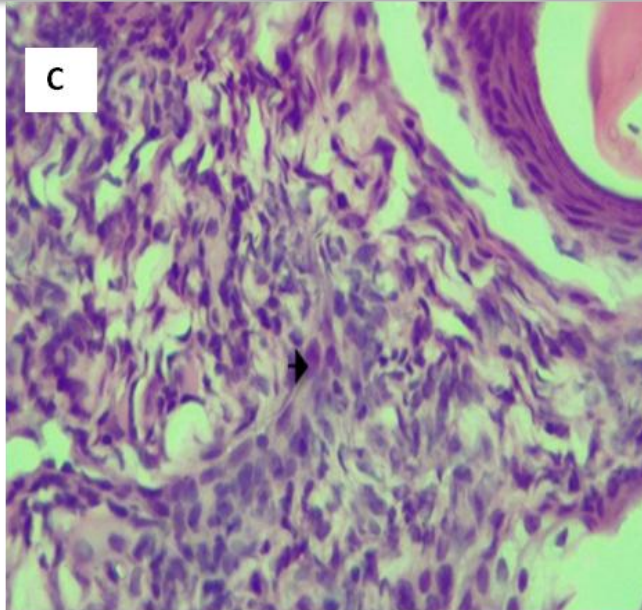
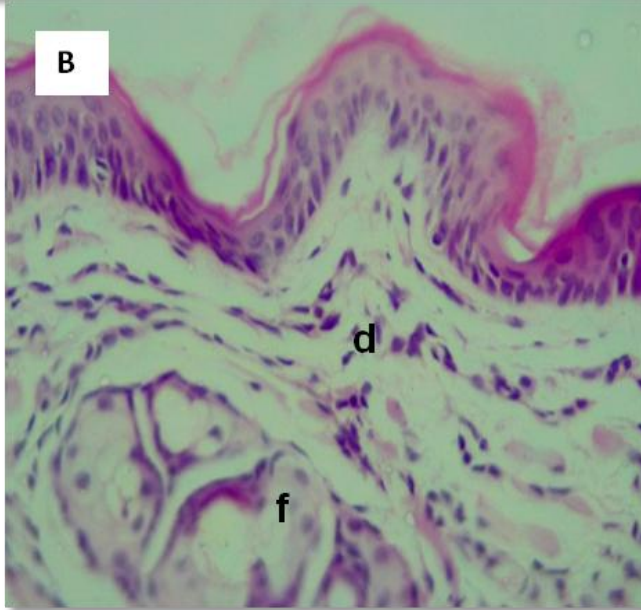
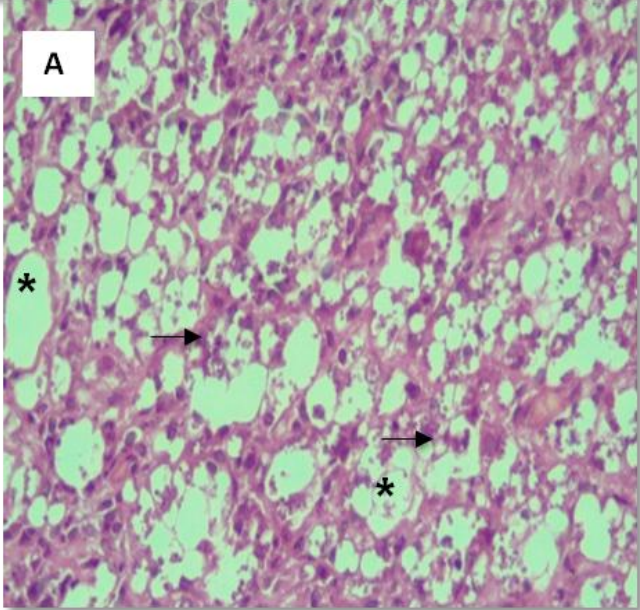
A figura 28 mostra cortes histológicos de lesão cutânea dos animais infectados e sem tratamento (controle) e tratados tanto com NPs Sb⁵⁺ quanto com Glucantime[®].

O controle negativo (animal infectado, mas não tratado) exibe dermatite com expressiva quantidade de amastigotas vacuolizadas, infiltrado inflamatório neutrofílico ++/3 em área granulomatosa. Também é possível observar alguns gigantócitos (célula gigante multinucleada) [Fotomicrografia 28A]. Esses achados são confirmados em estudos com hamsters e outras espécies de animais experimentais (LAURENTI et al., 1990; KAHL et al., 1991; SINAGRA et al., 1997; DONNELLY; LIMA; TITUS, 1998; ROBLEDO et al., 2012; GOMES-SILVA et al., 2013; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014), demonstrando que a infecção por *Leishmania* na pele é caracterizada por esse padrão histopatológico.

As fotomicrografias histológicas dos animais dos grupos tratados com Glucantime[®] (CIGII e CIGIm) mostram, respectivamente, dermatite granulomatosa com infiltrado celular neutrofílico e linfocítico (+/3), escassos macrófagos vacuolados (parasitas fagocitados) que se infiltram na derme, e infiltrado inflamatório difuso e perifolicular ++/3 (Fotomicrografias 28B e C).

É possível observar que a análise histopatológica da lesão cutânea tanto dos grupos de hamsters infectados e tratados com Glucantime[®] (CIGII e CIGIm) quanto os do grupo controle (animal infectado, mas não tratado) mostram alterações associadas ao processo de infecção semelhantes. Dados similares foram notados por Robledo et al. (2012).

Figura 28 - Fotomicrografia de cortes histológicos de lesão cutânea de hamsters infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, corados com HE. A- Animais infectados, não tratados (controle negativo): infiltrado inflamatório neutrofílico ++/3, macrófagos com grandes vacúolos (*) e amastigotas (seta), 40x. B- Animais tratados com Glucantime® (via IM): dermatite granulomatosa com abundantes macrófagos (ponta da seta) que se infiltram na derme, 40x. C- Animais tratados com Glucantime® (via IL): infiltrado inflamatório difuso (d) e folículo piloso (f), 40x. D- Animais tratados com ETSbL1[a]: focos de infiltrado inflamatório (d) e folículo piloso (f), 10x. E- Animais tratados com ETSbL2: infiltrado inflamatório difuso (d) e folículo piloso (f), 10x. F- Animais tratados com ETSbL1[b]: infiltrado inflamatório neutrofílico ++/3, macrófagos com grandes vacúolos (*), 10x.



Nos achados histológicos nas lesões cutâneas dos grupos tratados com NPs Sb⁵⁺ observou-se as seguintes alterações: ETSbL1[a] mostram focos de infiltrado inflamatório coalescente (++/3), compreendendo toda a extensão dérmica (Fotomicrografia 28D); ETSbL2 mostra epitélio com bastante infiltrado inflamatório difuso na área dermop profunda (+++/3) [Fotomicrografia 28E] e ETSbL1[b] é possível notar infiltrado inflamatório difuso (+++/3) com a presença de muitos macrófagos vacuolados com inclusão de amastigotas (Fotomicrografia 28F).

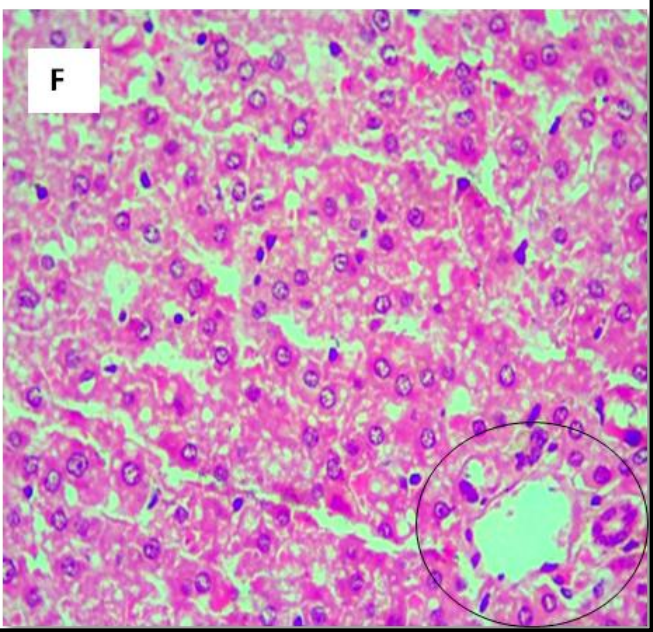
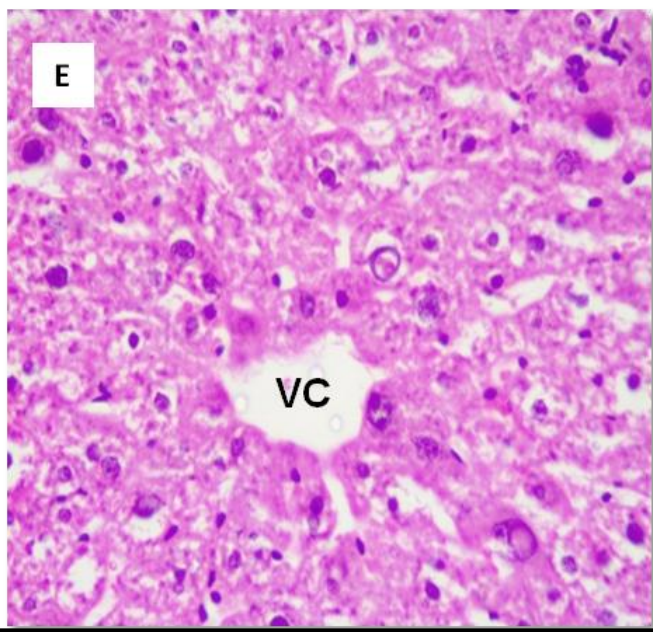
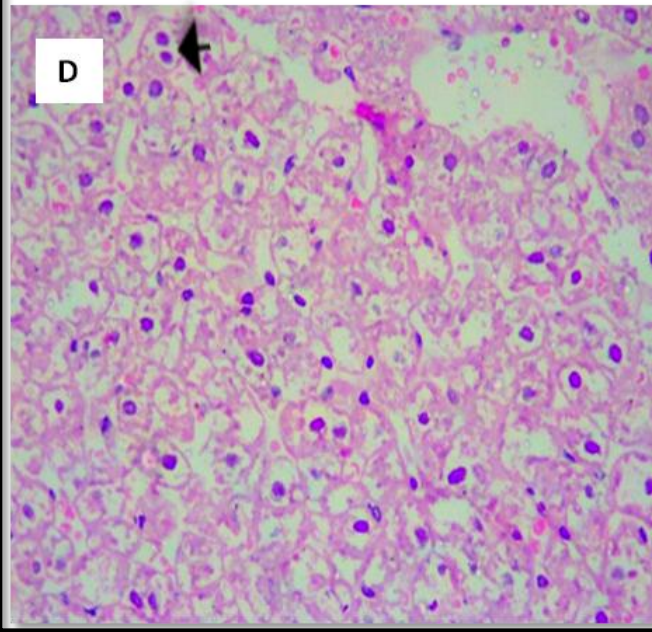
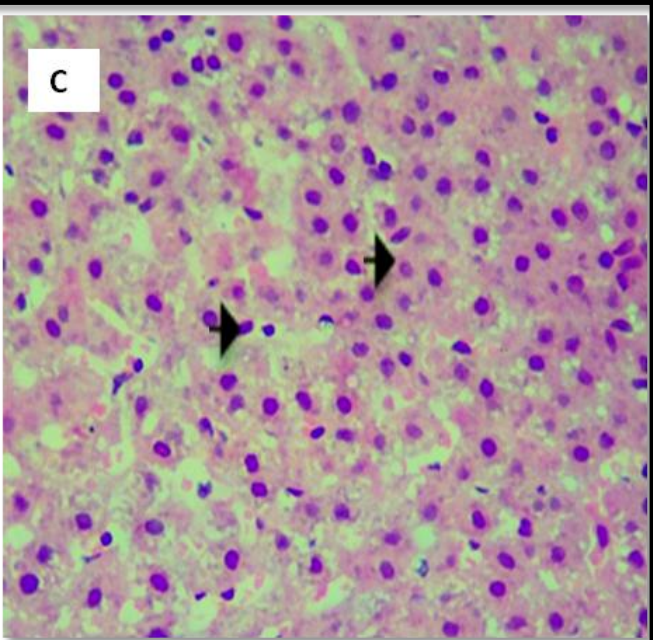
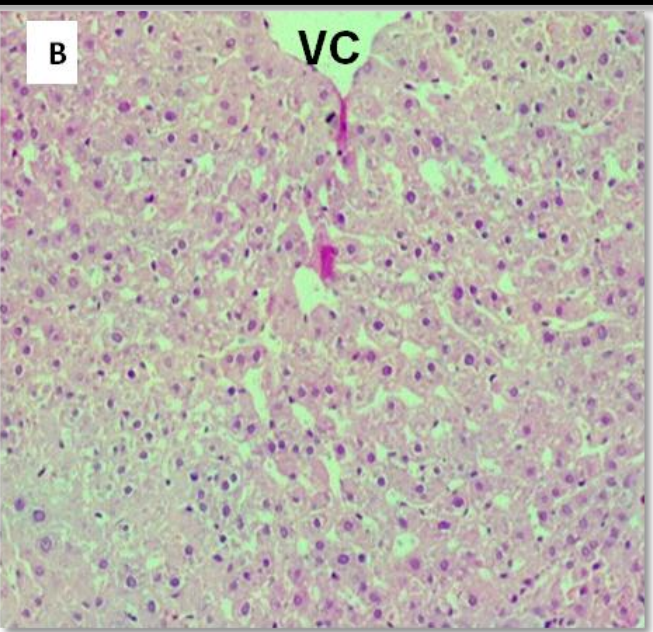
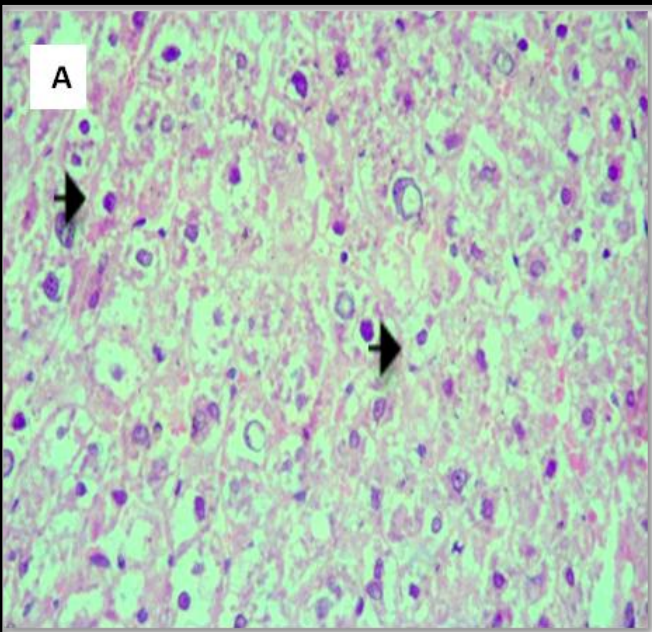
No geral, os achados histopatológicos frequentes na lesão cutânea dos animais nesse estudo nos sugere a associação à infecção por *Leishmania* e não propriamente a utilização de NPs Sb⁵⁺, pois é possível notar a presença de amastigotas internalizadas em macrófagos.

Quanto aos cortes histológicos do fígado, observou-se desde intenso infiltrado inflamatório até necrose de coagulação. A literatura relata que todo o arsenal terapêutico medicamentoso disponível para tratamento da leishmaniose é hepatotóxico (CROFT; COOMBS, 2003; SILVA, 2012; BRASIL, 2017). Por conseguinte, o princípio ativo aqui utilizado também está incluso.

O controle negativo (animal infectado, mas não tratado) apresentou infiltrados mononucleares focal e perivascular (Fotomicrografia 29A). A fotomicrografia dos animais do grupo tratado com Glucantime[®] por via intramuscular (CIGIm) mostra preservação da arquitetura hepática, mas também apresenta hiperplasticidade, desorganização e degeneração próximo das tríades (Fotomicrografia 29B), e o dano é visível da veia centro lobular para a tríade portal, evento chamado de teoria do ácido hepático; já as alterações do grupo tratado com Glucantime[®] por via intralesional (CIGIl) mostra degeneração hepática mais expressiva que a anterior (Fotomicrografia 29C).

Focos de inflamação no fígado também foram vistos no tratamento com as NPs Sb⁵⁺. A histologia dos animais tratados com ETSbL1[a] comprovou presença de degeneração celular, aumento de células sinusóides e apoptose (Fotomicrografia 29D). Já os tratados com ETSbL2 (Fotomicrografia 29E) apresentou áreas de necrose de coagulação. E os tratados com ETSbL1[b] exibiu uma área preservada, outra bastante degenerada, com destruição de núcleos, evento compatível com necrose de coagulação (Fotomicrografia 29F).

Figura 29 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, corados com HE. A- Animal infectado, não tratado (controle negativo): áreas com degeneração, núcleos picnóticos (ponta da seta), 40x. B- Animal tratado com Glucantime[®] (via IM): preservação da arquitetura hepática próxima à veia centro lobular (VC), presença de núcleos apoptóticos e o dano é da veia centro lobular para a tríade portal, 10x. C- Animal tratado com Glucantime[®] (via IL): mais expressiva que a anterior, presença de células de kupffer (seta) e perda da arquitetura hepática, 40x. D- Animal tratado com ETSbL1[a]: eosinofilia marcante, dilatamento dos sinusóides, raros hepatócitos binucleados (seta) e núcleos picnóticos, 40x. E- Animal tratado com ETSbL2: necrose extensa (eosinofilia), eventos de cariorex e cariólise, veia centrolobular (VC), necrose de coagulação, 40x. F- Animal tratado com ETSbL1[b]: eosinifilia extensa, hiper celular, núcleos binucleados, tríade portal (circulo),40x.



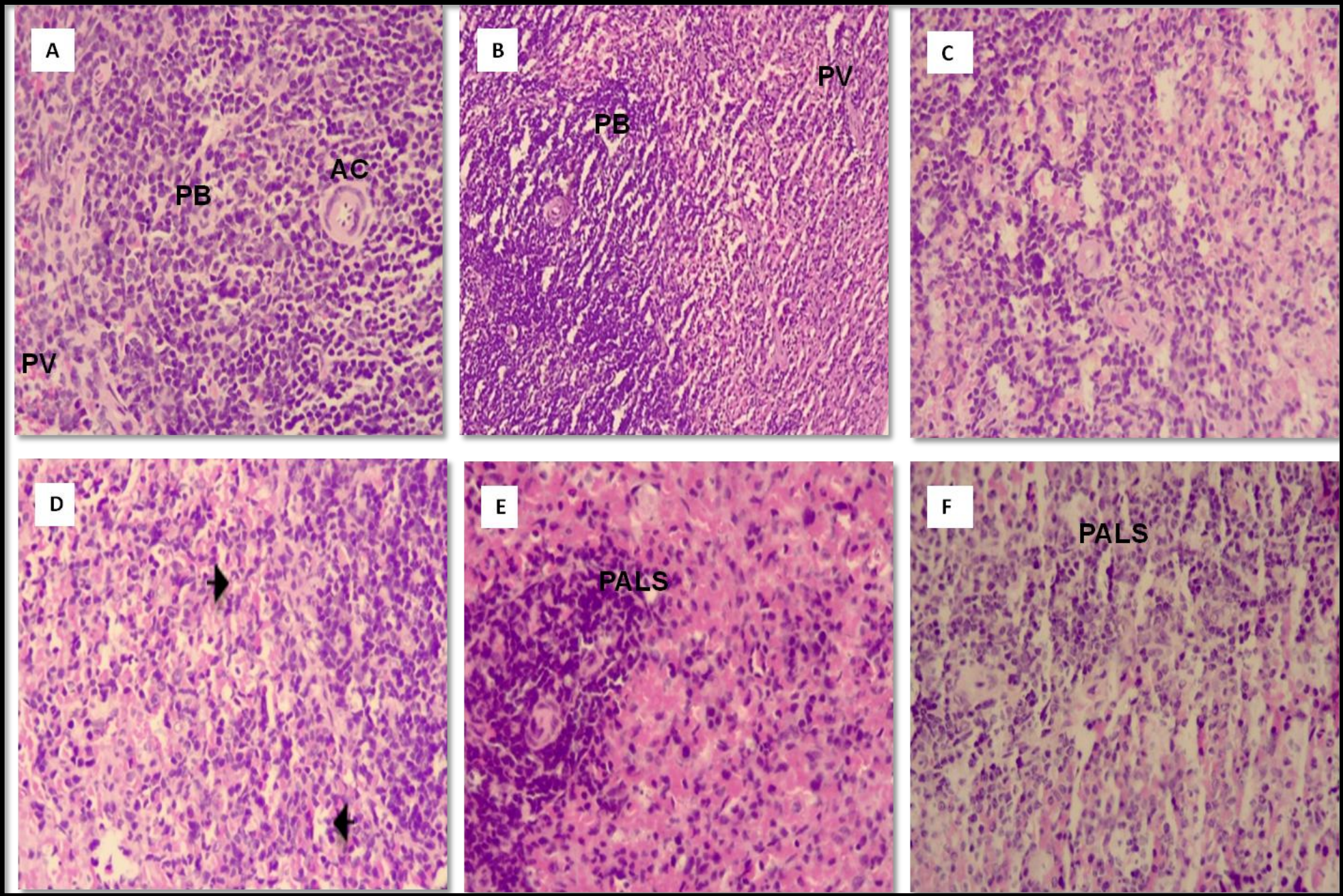
Nossos dados podem ser confirmados pelo estudo de Xie et al. (2011) que trata da distribuição e excreção de nanopartículas de dióxido de titânio (NPs TiO₂) administradas através de injeção intravenosa em camundongos, e demonstraram acúmulo das NPs em órgãos como fígado, baço e pulmão. Brandão (2012) em seu estudo em ratos Wistar com alguns tipos de NPs, nomeadamente nanopartículas de ouro (NPs Au) comprova que fígado e baço são órgãos preferenciais de acumulação dessas NPs. Ribeiro et al. (2014) também corroboram essa informação.

Fato semelhante foi observado por Saman et al. (2013) em estudo com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), onde foram testadas em ratos Wistar e os resultados demonstraram a toxicidade das NPs ZnO também no fígado dos animais.

A figura 30 apresenta cortes histológicos do baço dos animais, e os grupos controle negativo (animal infectado, mas não tratado) e Glucantime[®] por via intramuscular (CIGIm) não apresentaram alterações histológicas evidentes (Fotomicrografias 30A e B). No tratamento com Glucantime[®] por via intralesional (CIGII) foi possível observar área de polpa vermelha com seios (sinusóides) e cordões esplênicos ou - cordões de Billroth - que são cordões de células constituídos de linfócitos, macrófagos e plasmócitos, e a área de polpa branca apresenta desorganização do parênquima (Fotomicrografia 30C).

Na análise dos cortes histológicos tratados com ETSbL1[a] foi possível notar na área de polpa vermelha a presença de seios esplênicos [Fotomicrografia 30D]. Na avaliação do tratamento com ETSbL2 há a presença de sinusóides congestos e infiltrado peritrabecular. Aqui também é evidente a área de PALS - tecido linfóide ao redor da arteríola central, conhecido como bainha linfóide periarteriolar (Fotomicrografia 30E), e no tratamento com ETSbL1[b] também há a presença de áreas de PALS e desorganização esplênica (Fotomicrografia 30F).

Figura 30 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de hamsters infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, corados com HE. A- Animal infectado, não tratado (controle negativo): arquitetura esplênica preservada; áreas de Polpa Vermelha (PV) e Polpa Branca (PB) e arteria central (AC), 40x. B- Animal tratado com Glucantime[®] (via IM): arquitetura esplênica preservada, sem alteração histopatológica. 40x. C- Animal tratado com Glucantime[®] (via IL): área de polpa vermelha com sinusóides e Cordões de Billroth; desorganização do parênquima (no lado direito), 40x. D-Animal tratado com ETSbL1[a]: área de polpa vermelha com seios esplênicos (seta), 40x. E- Animal tratado com ETSbL2: área de PALS evidente, 40x. F- Animal tratado com ETSbL1[b]: presença de PALS e área de polpa vermelha com desorganização esplênica, 80x.



Segundo Moreira (2012) os principais órgãos responsáveis pela retirada de NPs da circulação sanguínea são o baço e o fígado. O baço é um órgão com intenso acúmulo de tecido linfóide e rico em células fagocitárias que em contato entre o sangue e essas células, representa um importante órgão de defesa do organismo. Assim, nossos achados histopatológicos no baço dos animais tratados com NPs Sb^{5+} podem ser esclarecidos pelo fato de ser um órgão linfóide interposto na circulação sistêmica.

Quanto à avaliação histológica do rim dos animais há evidências de alterações significativas no tecido renal após o tratamento com as NPs Sb^{5+} , com atenção para a maior concentração testada (18,6 mg/ Sb^{5+} /kg/dia). Entretanto, a nefrotoxicidade é considerada o evento adverso mais descrito das drogas usadas para tratar leishmaniose (RIBEIRO et al., 2014).

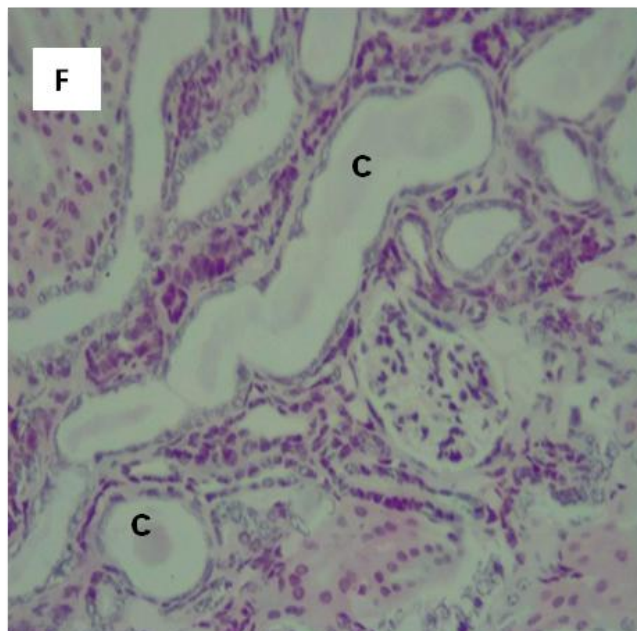
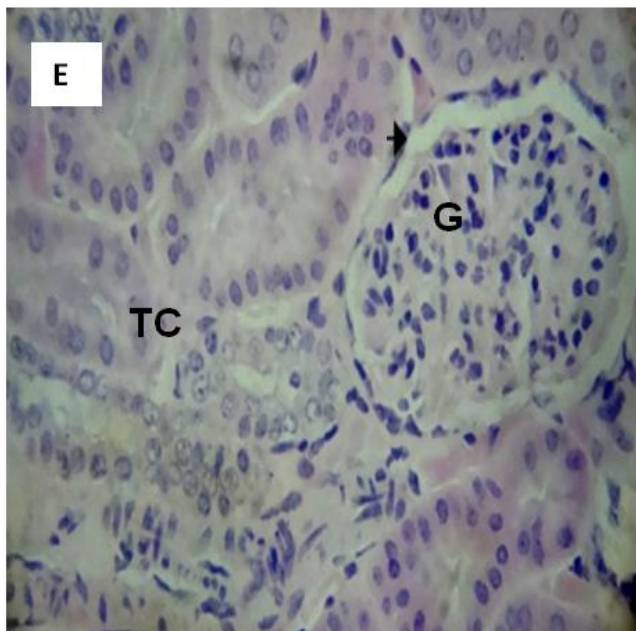
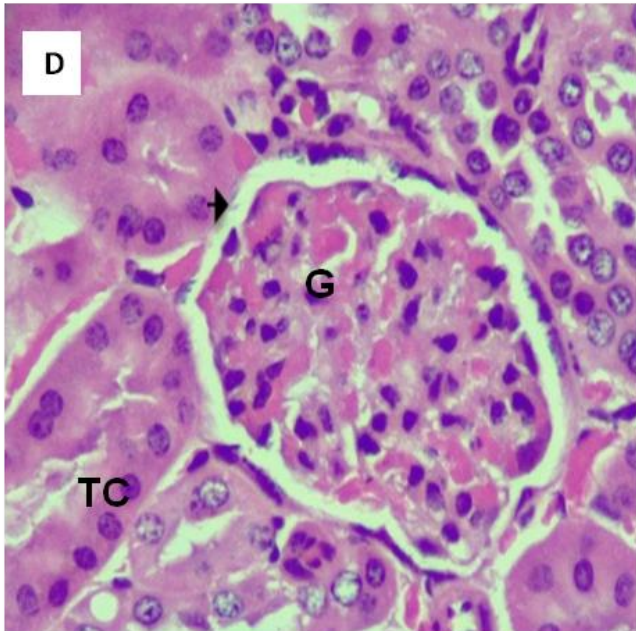
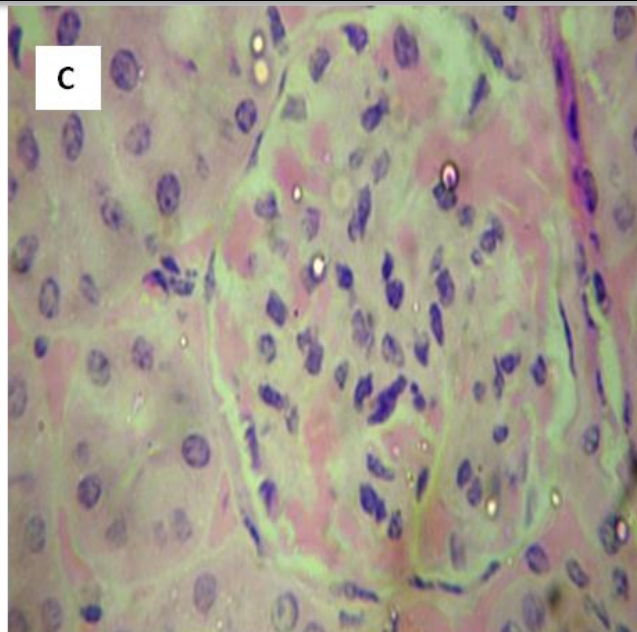
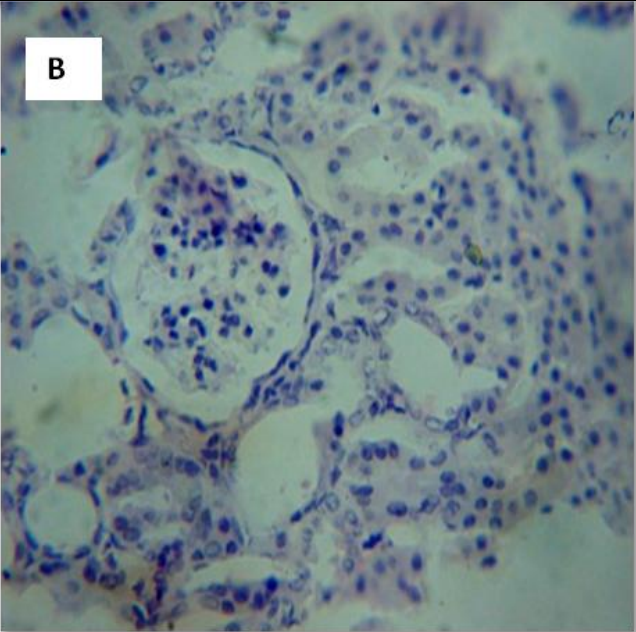
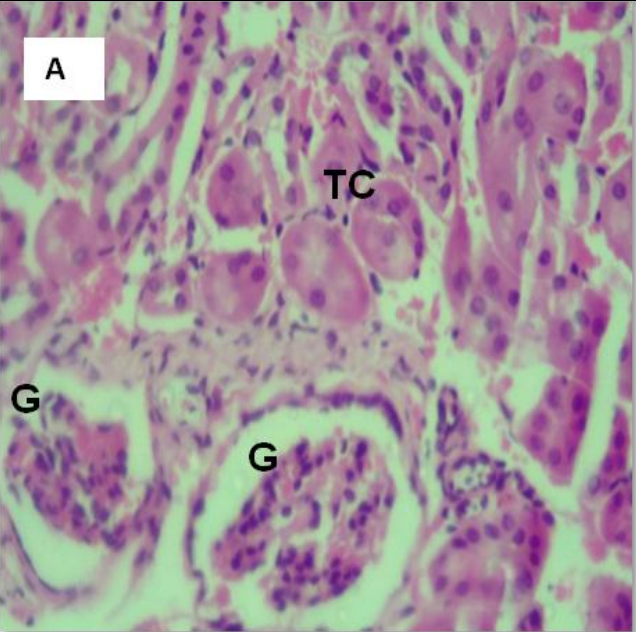
Os animais infectados e não tratados (controle negativo) apresentaram sofrimento tecidual (Fotomicrografia 31A). Isso pode ser explicado por Rocha (2012) que descreve que na infecção por *Leishmania* os mecanismos imunitários celulares vão originar um processo reativo tecidual caracterizado por uma reação inflamatória do tipo proliferativo, produzindo processos degenerativos e necróticos. Por exemplo, na resposta humoral, o mecanismo mais importante é a formação e o depósito de complexos imunes circulantes (CIC) que se formam através da união de um antígeno *Leishmania*, de uma IgG ou IgM específica e de frações do complemento (C3). E é o rim o órgão mais frequentemente afetado pela deposição dos CIC na membrana basal glomerular, originando glomerulonefrite.

Os tratados com Glucantime[®] (CIGIm) apresentaram desarranjo na arquitetura tubular e hiper celularidade nos túbulos contorcidos (Fotomicrografia 31B). Já os tratados por via intralesional (CIGII) não alterou a arquitetura tecidual renal, mostrando túbulos contorcidos proximal e distal, glomérulo e espaço de Bowman preservados (Fotomicrografia 31C).

As fotomicrografias histológicas de animais tratados com NPs Sb^{5+} mostram túbulos contorcidos proximal e distal, glomérulo e espaço de Bowman preservados com ETSbL1[a] (Fotomicrografia 31D) e hiper celularidade dos túbulos contorcidos, mas o espaço glomerular de Bowman preservado com ETSbL2 (Fotomicrografia 31E).

Alterações significativas foram observadas no tratamento com a maior concentração de NPs Sb^{5+} , ETSbL1[b], apresentando adelgaçamento tubular com presença de um epitélio cúbico simples baixo, hiper celularidade e cilindros hialinos na luz tubular (Fotomicrografia 31F). Conforme a literatura, estes cilindros são precipitados protéicos puros, e são geralmente encontrados nas doenças renais associadas à existência de proteinúria, como amiloidose e glomerulonefrites (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Figura 31 - Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de hamsters infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, corados com HE. A- Animal infectado, não tratado (controle negativo): túbulos contorcidos (TC) e glomérulos renais (G) com sofrimento tecidual, 40x. B- Animal tratado com Glucantime[®] (via IM): “dessaranjo” na arquitetura tubular e hiper celularidade nos túbulos contorcidos, 40x. C- Animal tratado com Glucantime[®] (via IL): sem alteração da arquitetura tecidual renal, 160x. D- Animal tratado com ETSbL1[a]: túbulos contorcidos (TC), glomérulo renal (G) e espaço glomerular de Bowman preservado (seta), 160x. E- Animal tratado com ETSbL2: hiper celularidade dos túbulos contorcidos e espaço glomerular de Bowman preservado (seta), 80x. F- ETSbL1[b]: adelgaçamento dos túbulos contorcidos e presença de cilindros hialinos no lúmen (c), 40x.



Danos renais também foram observados em camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com nanopartículas de anfotericina B, contendo moléculas de quitosano e sulfato de condroitina (NQC-AmpB) [RIBEIRO et al., 2014].

Na leishmaniose visceral em humanos os danos renais estão associados não só a doença em si, mas também a terapia administrada de acordo com Clementi et al. (2011). De fato, os agentes usados na terapêutica da doença, como os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina, miltefosina, paromomicina e simataquina, estão associados a um alto risco de toxicidade renal. Já na leishmaniose cutânea há poucos estudos que demonstrem disfunção renal, sendo associada ao uso de tratamento específico com drogas antimoniais pentavalentes que são rapidamente eliminadas através dos rins (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

O estudo histológico, ora feito, mostrou a presença de alterações após tratamento com as NPs Sb^{5+} , sugerindo que as NPs estejam sendo fagocitadas nesses órgãos. Porém, não podemos confirmar essa hipótese, pois não houve análise pela técnica de MET no fígado, baço e rim. Entretanto, Robledo et al. (2012) afirmam que várias alterações histopatológicas aqui notadas também correspondem tanto ao processo de infecção como a um processo fisiológico nos hamsters, não associando especificamente ao efeito tóxico de um composto testado.

CONCLUSÃO

O conjunto de informações obtidas no estudo pré-clínico em hamster experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados com NPs Sb^{5+} por 26 dias, com doses diárias por via intralesional, demonstrou que se compararmos as NPs Sb^{5+} ao tratamento intralesional com Glucantime[®] a ação é similar. Esperava-se a cura clínica dos animais tratados com Glucantime[®], pois é a droga preconizada para o tratamento da leishmaniose cutânea pela Organização Mundial da Saúde, mas foi a suspensão ETSbL1[b] que apresentou maior eficiência quanto a “cura clínica” referente a redução no tamanho da lesão e na carga parasitária entre as NPs testadas.

Diante da análise realizada neste trabalho e em conjunto com a literatura científica, é possível observar que de forma geral as NPs possuem efeito contra algumas espécies de *Leishmania*, apresentando redução no tamanho das lesões localizadas e certa toxicidade pelos achados histopatológicos.

Estes resultados sugerem novos testes em outras espécies animais (camundongos) menos suscetíveis a infecção, objetivando uma possível cura clínica e parasitológica com melhor adequação do tempo de tratamento e acompanhamento da infecção mais prolongado.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. G. **Complexo anfifílico de antimônio: atividade leishmanicida in vitro e eficácia de uma formulação tópica em modelo murino de leishmaniose cutânea.** 2012. 81 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia. 2012.

AMENEH, S. et al. **Inhibition of Leishmania major growth by Ultraviolet radiation B with Silver nanoparticles in an animal model.** Resumo de Congresso: Advances in Nano, Biomechanics and Energy research, Seoul, Korea, 2013.

AUFFAN, M.; et al. In Vitro Interactions between DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles and Human Fibroblasts: A Physicochemical and Cyto-Genotoxicity Study. **Environ. Sci. Technol.** 40, 4367, 2006.

AWASTHI A., MATHUR R. M., SAHA B. Immune response to Leishmania infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, p. 238-258, 2004.

BEHESHTI, N. et al. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*. *In vitro* and *in vivo* studies. **J Trace Elem Med Biol**, 27 (3), 203-207, 2013.

BERRY, C. CURTIS, A.S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for application in biomedicine. **Journal Physic D: Applied Physic**, 36:198-206, 2003.

BOZZOLA, J.J; RUSSELL, L.D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists.** 2 ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1998. 670p.

BRANDÃO, A. S. T. **Estudos de Biodistribuição e Toxicidade de Nanopartículas de Ouro no Rato – Influência do Tamanho e Revestimento.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose**

tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017. 190 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2013. 180 p.

CARVALHO, R. F. **Estudo in vivo da ação de nanocapsulas de PLGA contendo anfotericina B, DMSA e Nanopartículas magnéticas no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6 causada pela *L. amazonensis***. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2011.

DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Novas embalagens para medicamentos à base de Antimônio usados no tratamento da Leishmaniose e esquistossomose. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 6, p. 24-30, 2005.

CDC. Parasites. Leishmaniasis. 2013. Available at: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>. Accessed April 02, 2014.

CHEN, S. et al. Combined detection of breast cancer biomarkers based on plasmonic sensor of gold nanorods. **Sensors Actuators B Chem.** 221, 1391– 1397, 57, 2015.

CHEN, C.; et al. Multihydroxylated $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ Nanoparticles: Antineoplastic Activity of High Efficiency and Low Toxicity. **Nano Lett.**, 5, 2050, 2005.

CHENG, J. P. X.; NICHOLS, B. J. Caveolae: One Function or Many? **Trends in Cell Biology**. v. 26, 3, 177–189, 2016.

CLEMENTI, A. et al. Renal involvement in leishmaniasis: a review of the literature. **NDT Plus**, 0: 1–6, 2011.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.** 19(11):502–508, 2003.

COPPELAND, N. K.;; ARONSON, N. E. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. **Curr Opin Infect Dis**, 28:5, 426–437, 2015.

DARROUDI, M.; et al. Synthesis and characterization of UV-irradiated silver/montmorillonite nanocomposites. **Solid State Sci.** ;11:1621–1624, 2009.

DEA-AYUELA, M. A. et al. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. **Veterinary Research Communications** 31, 703–717, 2007.

DEN BOER, M. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clin Microbiol Infect**, 17(10):1471–7, 2011.

DONELLY, K. B.; LIMA, C. L.; TITUS, R. G. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence and absence of sand fly vector salivary gland lysate. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 1, p. 97-103, 1998.

DNDi, **Boletim informativo da redeLEISH**. 1. ed., pg 1-12, 2016.

ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e do gato**. (5ª edição), Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FOLDBJERG, R.; et al.. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. **Toxicol Lett.**, 190(2):156–162, 2009.

GOMES-SILVA, A.; et al. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Parasitology**, 140, 771–779, 2013.

GOTO, H.;LINDOSO, J. A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 37, 615– 623, 2004.

HARTGERS, F.C.; YAZDANBAKHSH, M. Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. **Parasite Immunol.**, 28(10):497-506, 2006.

JEBALI, A.; KAZEMI. B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis.**Toxicol In Vitro.**, 27(6):1896-904, 2013.

KAHL, L. P.; et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in três braços, Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.44, n.2, p. 218-232, 1991.

KEVRIC, J.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J.H. New World and Old World Leishmania Infections. A Practical Review. **Dermatol Clin**, 33, 579–593, 2015.

KHOSRAVI A.; et al. Anti-leishmanial effect of nanosilver solutions on *Leishmania tropica* promastigotes by *in-vitro* assay. **ZJRMS**. ;13:8–12, 2011.

KIM, J.; et al. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. **Toxicol Sci.**, 89(1):338–347, 2006.

KUO, W. S.; et al. Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy. **Biomaterials** 33, 3270–3278 (2012).

KVÍTEK, L.; et al. IOP Publishing; Antibacterial activity and toxicity of silver–nanosilver versus ionic silver. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 304, n. 1, 2011.

LAURENTI, M. D.; et al. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. **Int J Exp Pathol**, v. 71, n.6, p. 791-797, 1990.

MANSUETO, P. et al., Leishmaniasis in travelers: A literature review, **Travel Medicine and Infectious Disease**, xx, 1-19, 2014.

MAYELIFAR, K. et al. Ultraviolet B efficacy in improving antileishmanial effects of silver nanoparticles. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. 18(7):677-683, 2015.

MEARS, E.R. et al. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** 9(9): e0003889, 2015.

MORENO, E. et al. Assessment of β -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice. **Nanomedicine**, 11(8):2003-12, 2015.

MOREIRA, Vanessa Carvalho. Múltiplas injeções de nanopartículas magnéticas a base de maguema recobertas com ácido meso -2,3- Dimercaptosuccínico em camundongos: biocompatibilidade e toxicidade. **2012. 72 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2012.**

NICOLLE, G.L. Culture du parasite du Bouton d'Orient. **C.R.Acad. Sci.**, 146: 842-843. 1908.

NOVY, F.G.; McNEAL, W.J. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. **J. Infect. Dis.**, 1: 1-30. 1904.

OLIVEIRA, R.A.; et al. Avaliação da função renal em pacientes com leishmaniose cutânea americana após tratamento específico com antimônio pentavalente. **BMC Nephrol**, 13:44, 2012.

OLIVEIRA, R.A.; et al. Disfunção renal em pacientes com leishmaniose cutânea americana. **Kidney Int.**, 80: 1099-106, 2011.

RANGHAR, S. et al. Nanoparticle-based Drug Delivery Systems: Promising Approaches Against Infections. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.57 n.2: pp. 209-222, 2014.

REMÍGIO HENRIQUES, C.I.; RUIZ, M.A.; ARIAS, J.L. Nanotechnology and the diagnosis/treatment of leishmaniasis. **Ars Pharm.**, 55(3): 01-10, 2014.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica.** Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2001.

RIBEIRO, T.G.; et al. An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis. **International Journal of Nanomedicine**. 9: 5341-5353, 2014.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P.; et al. Comparative Evaluation of Lesion Development, Tissue Damage, and Cytokine Expression in Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Infected by Inocula with Different *Leishmania (Viannia) braziliensis* Concentrations. **Infection and Immunity**, 82 (12), p. 5203–5213, 2014.

ROBLEDO, S. M. et al. Cutaneous Leishmaniasis in the Dorsal Skin of Hamsters: a Useful Model for the Screening of Antileishmanial Drugs. **Journal of Visualized Experiments**, 62, e3533, 1- 9, 2012.

ROCHA, A. G. **Leishmaniose visceral canina no Rio Grande do Sul, revisão bibliográfica**. TCC – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

RODRIGUES, Raquel Ferreira. **Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* dos compostos mesoiônicos tiadiazóis**. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2007. 131 f. Rio de Janeiro, 2007.

SAMAN, S. et al. Histopathological Effects of ZnO Nanoparticles on Liver and Heart Tissues in Wistar Rats. **Adv. Biores**, 4 (2): 83- 8, 2013.

SERENO, D.; et al. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob. Agents Chemother**, 42, 3097, 1998.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SILVEIRA, F.T. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v.22 (1), 2008.

SINAGRA, A. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 57, n. 1, p. 115-118, 1997.

SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, 5:19. 2016.

SHAKED-MISHAN, P.; et al. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 276 (6), p. 3971-6, 2001.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 40, n. 2, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of leishmania infantum-infected Dogs. **J. Comp. Pathol.**, v.130, p.7-12, 2004.

SHIN, J.; ABRAHAM, S. M.; Cell biology. Caveolae--not just craters in the cellular landscape. **Science**, 293, 1447, 2001.

TEIXEIRA, Priscila Rios. **Estrutura e Propriedades de Nanopartículas de Ouro Sintetizadas na Presença de Polímeros**. Dissertação (MESTRADO) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2016.

TOLOSA, E.M.C. et al. **Manual de técnicas histológicas para histologia normal e patológica**. 2 ed. Barueri: Manole, 2003, 331p.

TORABI, N. et al. Nanogold for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): An animal trial with methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis*. **J Pharm Health Sci** ,1(1): 11-14, 2012.

XIE, G. P.; et al. Tissue distribution and excretion of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles. **Toxicol Lett**, 205: 55-61, 2011.

YEHIA, H. N.; et al. Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. **J. Nanobiotechnol**, 23(5), 8, 2007.

ZHANG, L. et al. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Curr Med Chem.**,17(6):585-94, 2010.

WANG, Z. Caveolae-mediated Delivery of Therapeutic Nanoparticles across Blood-endothelial Barrier. **Austin journal of analytical and pharmaceutical chemistry.**; 1(4):1018, 2014.

WHO. Control of the leishmaniases. World Health Organization technical report series, 2010.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 02 Fev. de 2015.

WYLLIE, S., CUNNINGHAM, M. L., FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 279 (38), p. 39925-32, 2004.

5. DISCUSSÃO GERAL

A Leishmaniose é uma doença tratável, mas a complexidade das diversas formas clínicas, a variação de sensibilidade entre as espécies do parasita e o aumento da resistência ao medicamento fazem com que os esquemas adotados sejam extremamente variáveis. Infelizmente, para a leishmaniose, os tratamentos mais eficazes são os de esquemas terapêuticos mais complexos e com efeitos tóxicos mais acentuados (CASTRO, 2013; BRASIL, 2017).

Historicamente, o padrão-ouro da terapia sistêmica da doença é com antimoniais pentavalentes (MANSUETO et al., 2014) e segundo Guerra et al. (2011) esses medicamentos apresentam várias falhas, incluindo a necessidade de administração parenteral a longo prazo, a ocorrência de muitos efeitos indesejáveis (incluindo cardiotoxicidade e pancreatite), bem como a resistência a medicação. E apesar de ser empregado há muitos anos no tratamento das leishmanioses o mecanismo de ação desse fármaco não está completamente esclarecido. Entretanto, outras opções terapêuticas foram adotadas ao longo dos anos, incluindo Pentamidina, Anfotericina B e Miltefosina, que também apresentam efeitos indesejáveis e alto custo (CHRUSCIAK TALHARI, 2009; CROFT; OLLIARO, 2011; BRASIL, 2013; 2017; CDC, 2016).

O progressivo aumento de resistência às drogas preconizadas representa um sério problema no tratamento das leishmanioses (RATH et al., 2003). Em face dessas limitações, a Organização Mundial da Saúde recomenda o incentivo à busca de novos medicamentos, tratamentos com drogas alternativas, reposicionamento de fármacos, poliquimioterapia ou tratamentos combinados (WHO, 2010). Daí o interesse em se manipular drogas antigas de forma que a apresentação seja distinta e que a mesma possa ser até mesmo associada numa forma tópica ou menos invasiva, em menor dose e tempo de tratamento.

Diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para obtenção de novas formulações farmacêuticas sejam estas com produtos naturais, sintéticos ou semissintéticos, visando à liberação controlada de fármacos capazes de manter ou ampliar a ação de agentes promissores utilizados no combate e controle da doença (JAIN et al., 2011; GUTIERREZ et al., 2016).

Prahu, Patravale e Joshi (2012) consideram que o principal desafio no tratamento da leishmaniose é o fato de que o parasita infecta o macrófago, portanto, os fármacos leishmanicidas tradicionais enfrentam dificuldades para penetrar no interior dessas células para matar o parasita. Nesse contexto, técnicas inovadoras vêm demonstrando o grande potencial da nanotecnologia farmacêutica, com o desenvolvimento de nanotransportadores, por exemplo, as nanopartículas (NPs), que têm obtido sucesso para a entrega sítio-específico em tratamentos experimentais para leishmanioses, mostrando ser uma abordagem promissora no tratamento da doença (PIMENTEL et al., 2007; ROSSI-BERGMANN et al., 2012; JEBALI; KAZEMI, 2013; CHAKRABORTY et al., 2014; JEBALI et al., 2014).

De acordo com Jain e Jain (2013) e Khalil et al. (2013), estas NPs têm a capacidade de penetrar em macrófagos, liberar a droga dentro da célula, levando a uma alta concentração local da droga e, finalmente, matar os protozoários. Nesse sentido, a principal estratégia no tratamento da leishmaniose é direcionar os medicamentos aos macrófagos infectados usando nanotransportadores, pois estes têm a capacidade de superar as barreiras biológicas. Isso pode ser visto nesse estudo com nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb⁵⁺), pois foi possível notar, através de fotomicrografias, a presença das NPs Sb⁵⁺ no interior de macrófagos infectados.

Outros estudos avaliaram NPs de prata (NPsAg), ouro (NPsAu), dióxido de titânio (NPsTiO₂), óxido de zinco (ONPsZn) e óxido de magnésio (NPsMgO) em *Leishmania major* e o resultado *in vitro* mostrou atividade tanto à luz ultravioleta quanto a infravermelho, aumentando a propriedade leishmanicida das NPs, mas apresentaram alta citotoxicidade em macrófagos, indicando que essas NPs podem ter consequências positivas e negativas no tratamento da LC (JEBALI; KAZEMI, 2013; JEBALI et al., 2014). Do mesmo modo, Mohebal et al. (2009) também demonstraram em seu trabalho que as NPs Ag foram eficazes para o controle da infecção secundária da LC localizada.

Nanopartículas de arsênio (NPs As) foram produzidas por Chakraborty et al. (2014) e suas propriedades foram testadas contra *Leishmania donovani*, demonstrando ter potencial leishmanicida, pois apresentou inibição do crescimento *in vitro* e da proliferação intramacrofágica. Fato este observado no tratamento com as NPs Sb⁵⁺.

Da literatura revisada, muitos estudos demonstram resultados encorajadores que nos permitiram pensar que a nanotecnologia poderia desempenhar um papel prudente no futuro, devido às suas propriedades, especialmente se compararmos com o atual tratamento da doença. Romero e Morilla (2008) e Costa Lima et al. (2014) descrevem ainda que esta tecnologia pode revelar-se superior, pois inclui redução do custo do fármaco, biodisponibilidade melhorada e menor toxicidade do fármaco, o que definitivamente aumenta a adesão do paciente ao tratamento.

Até hoje, a Anfotericina B lipossomal (AmBisome®) é a única droga antileishmania baseada em nanotecnologia, que tem uso na prática clínica, mas apesar de apresentar vantagens como eficácia comprovada e baixa toxicidade que a tornam uma excelente alternativa, seu uso permanece restrito em algumas áreas devido ao alto custo (GUTIERREZ et al., 2016)

As informações resultantes desse estudo servem como embasamento para próximos estudos fundamentados no uso de nanopartículas no tratamento da LC, uma vez que foi possível observar que as NPs Sb^{5+} possuem efeito contra *L. (L.) amazonensis*, apresentando diminuição no tamanho das lesões localizadas, levando a reepitelização das lesões cutâneas e a alta redução da carga parasitária, fato importante por ter ocorrido em animal altamente suscetível como o hamster em tratamento acompanhado por 26 dias. A continuidade desse estudo é necessária de modo a avaliar alguns outros parâmetros, considerando-se as NPs Sb^{5+} como fortes candidatas ao tratamento da LC.

6. CONCLUSÕES FINAIS

Durante a realização deste trabalho, obtiveram-se as conclusões a seguir:

- Pela primeira vez é mostrada a atividade de nanopartículas de antimônio pentavalente (NPs Sb^{5+}) contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;
- As NPs Sb^{5+} apresentaram tamanho nanométrico, formato adequado, monodispersas e valores negativos de potencial zeta, características adequadas para o uso biológico;
- A superfície das NPs Sb^{5+} foi tratada com ligantes com alta afinidade para receptores-alvo de membrana celular, com consequente aumento da concentração de Sb^{5+} e potência terapêutica dentro dos macrófagos infectados, favorecendo a atividade antileishmania;
- A suspensão mais promissora *in vitro* foi a ETSbL2 que apresentou alta atividade antileishmania com valor de CE_{50} 1.05 mg/mL contras as formas promastigotas e contra macrófagos de linhagem J774 infectados com amastigotas sem destruir a célula hospedeira; também proporcionou menor toxicidade sobre macrófagos com 62,1% de viabilidade celular na primeira concentração (0,81 mg/ Sb^{5+} /mL);
- No ensaio *in vivo* a suspensão ETSbL1[b] apresentou maior eficiência quanto a “cura clínica” referente a redução no tamanho da lesão e na carga parasitária entre as NPs testadas, sendo considerada forte candidata ao tratamento da LC;
- O estudo histológico em todos os órgãos analisados mostrou evidências de alterações significativas nos grupos de animais infectados e não tratados, tratados com Glucantime[®] e tratados com NPs Sb^{5+} , indicando a não associação dessas alterações apenas ao efeito tóxico das NPs Sb^{5+} ;
- O estudo permite concluir que o preparo da suspensão de NPs Sb^{5+} apresenta protocolo de fácil execução, de baixo custo, que mantém suas propriedades químicas em pelo menos 12 meses (tempo de observação) a temperatura de 25° C, é facilmente reprodutível e apresenta um elevado

potencial de uso no tratamento localizado da forma cutânea da Leishmaniose, já que as NPs Sb^{5+} foram capazes de manter a atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo*, mesmo com concentrações menores de antimônio pentavalente.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas de aprimoramento, o grupo pretende produzir as suspensões mais promissoras e testar outras vias de administração e protocolos de tratamento em camundongos, fazer uso de métodos moleculares para quantificação mais precisa da carga parasitária, verificar o perfil de biodistribuição, incluindo avaliações bioquímicas e toxicológicas, averiguar a via metabólica de ação da droga, realizar estudos de microhemodiálise nos modelos animais para avaliação da concentração e eliminação da droga no organismo via sistêmica, além de realizar marcação dos parasitas para análise por microscopia confocal objetivando focar nos possíveis mecanismos de ação das NPs Sb^{+5} .

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M.G. et al. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. **J Antimicrob Chemother.** 64(6):1234-40, 2009.
- ALMEIDA, Olga Laura Sena; SANTOS, Jussamara Brito. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n.3, p.497-506. 2011.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A.J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **HistcienciaSaúde/Manguinhos**, 10(3): 853-882, 2003.
- ALVAR, J.; et al. Leishmaniasis Worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, 7: 356-71, 2012.
- AMATO, V.S.; et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **Am J Trop Med Hyg. United States**; 77(2):266–74, 2007.
- AREVALO, J. et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary Leishmaniasis. **J Infect Dis.** 15;195(12):1846-51, 2007.
- ARMIJOS, R. X.; WEIGEL, M. M.; IZURIETA, R.; RACINES, J.; ZURITA, C.; HERRERA, W. & VEGA, M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador. **Tropical Medicine & International Health**, 2:140-152, 1997.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, 119(6):238-58, 2004.
- BAILEY, M; LOCKWOOD, D. Cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol.** 25(2):203-11. 2007.
- BASANO, S.A; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia.** 7: 328. 2004.
- BARBOZA-FILHO, C. G. et al.; The influence of natural rubber/Au nanoparticle membranes on the physiology of *Leishmania brasiliensis*. **Experimental Parasitology.** v. 130: 2, p. 152–158, 2012.
- BEN SALAH, A. et al.; Wr279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. **PLoS Negl Trop Dis**, 3: e432, 2009.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol.** Aug. v.37, n. 10, p. 1097-106, 2007.

BERMAN, J.D.; GALLALEE, J.V.; BEST, J.M. Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid β -oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem. Pharmacol.** 36:197-201, 1987.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Rev Infect Dis** 10: 560-586, 1988.

BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Curr Opin Infect Dis.**16(5):397-401, 2003.

BERMUDEZ, H. et al. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary Leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.** 100(7):591-600, 2006.

BHARDWAJ, S.; SRIVASTAVA, N.; SUDAN, R.; SAHA, B. *Leishmania* Interferes with Host Cell Signaling to Devise a Survival Strategy, **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, Article ID 109189, 13 pages, 2010.

BLUM, J.A.; HATZ, C.F. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Travelers. **Journal of travel Medicine**, v.16, n.2, p.123-131, 2009.

BOZZOLA, J.J; RUSSELL, L.D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists.** 2 ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1998. 670p.

BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. **Biosystems**, 65: 123-138.

BRAGA, T. G. **Comparação da heterogeneidade genética e da sensibilidade *in vitro* ao Antimoniato de Meglumina entre amostras de *Leishmania braziliensis* isoladas de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento da leishmaniose cutânea.** 2012. 92 f. Tese Doutorado (Doutorado em pesquisa clínica em doenças infecciosas). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014**, 9. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015. 228 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.**[recurso eletrônico]/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2013.180 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017. 190 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 136 p

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007. 182 p.

BRUSTOLONI, Y. M. et al. Treatment of visceral leishmaniasis in children in the Central-West Region of Brazil. *Infection.*, 38(4):261-7, 2010.

CABALLERO, A. B.; SALAS, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Metal-Based Therapeutics for *Leishmaniasis*. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, Dr. David Claborn (Ed.), In Tech, 2014.

CALDERON, L. A. et al. Amazonian biodiversity: a view of drug development for Leishmaniasis and Malaria. *J Braz Chem Soc*, 20: 1011-1023. 2009.

CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*, 1:34-7, 2003.

CARVALHO, R. F. **Estudo in vivo da ação de nanocapsulas de PLGA contendo anfotericina B, DMSA e Nanoparticulas magnéticas no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6 causada pela *L. amazonensis***. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2011.

CASTRO, R. A. O. **Avaliação da atividade leishmanicida do antimônio trivalente livre ou em formulação lipossomal convencional, associado ou não ao ácido ascórbico, em camundongos Balb/c infectados com *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. 95 f. 2013

CDC. **Leishmaniasis. Resources for Health Professionals**.4, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 12 janeiro 2015.

CHANG, K.P. *Leishmania donovani* macrophage binding mediated by surface glycoproteins/antigens. *Mol Biochem Parasitol*. 4: 67-76. 1981.

CHRUSCIAK TALHARI, A. **Pesquisa clínica para avaliar a eficácia e segurança da miltefosina oral em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania guyanensis*, comparada ao tratamento com antimônio pentavalente**. 2009. 132f. Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Amazonas/Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus, Amazonas.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. et al. Randomized controlled clinical Trial to Assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 84, 255-260, 2011.

CHAKRABORTY, S. et al. Novel Arsenic Nanoparticles are more effective and less toxic than as (III) to inhibit extracellular and intracellular proliferation of *leishmania donovani*. **Journal of Parasitology Research**, 2014.

CHATELAIN, E.; IOSET, J.R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Des Devel Ther**, 5: 175–181, 2011.

CONDE, J. P. **Nanomateriais**. Boletim da SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA. N.º 97, Abril – Junho 2005, 57-59.

CORBETT, J. et al. Nanotechnology: **International Developments and Emerging Products**. CIRP Ann - Manuf Technol. 49:523– 45, 2000.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**. 19(11):502–508, 2003.

CROFT, S.L .; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**. 19(1): 111–126, 2006.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. **Clin Microbiol Infect**, 17: 1478–1483, 2011.

COSTA, J. D. S. **Síntese e caracterização toxicológica de diferentes tipos de nanopartículas de ouro. Estudos in vitro e in vivo**. 2015. 127f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

COSTA LIMA, S. A.; et al. Crucial CD8+ T-lymphocyte cytotoxic role in amphotericin B nanospheres efficacy against experimental visceral leishmaniasis. **Nanomedicine: NBM**, 10, 1021–1030, 2014.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol Ther**. 22(6):491-502, 2009.

DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev**. 59, 505–521, 2007.

DEMICHELI, C., FRÉZARD, F., LECOUEVEY, M., GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony (V) complex formation with adenine nucleoside in aqueous solution. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1570, p. 192, 2002.

DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Novas embalagens para medicamentos à base de Antimônio usados no tratamento da Leishmaniose e esquistossomose. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 6, p. 24-30, 2005.

DENTON, H., MCGREGOR, J. C., COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochem J**, v. 381 (Pt 2), p. 405-12, 2004.

DE SOUZA, R.F. et al. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral Leishmaniasis diagnosis. **Acta Trop**, 125:60-66, 2013.

DORLO, T. P. C.; et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother**, 2012.

DNDi, **Boletim informativo da redeLEISH**. 1. ed., pg 1-12, 2016.

DUNNE, M. BIBBY, D.C.; JONES, J. C.; CUDMORE, S. Encapsulations of protamine sulphate compacted DNS in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. **J. Contr. Rel.**, v.92, p.209-219, 2003.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. "**Nanotecnologia**". São Paulo, Art Liber:1-201, 2006.

EL-ON, J.; SNEIER, R.; ELIAS-E. *Leishmania major*. Bacterial contamination of cutaneous lesions in experimental animals. **Isr J Med Sci** 28: 847-851, 1992.

EL-TONSY, M. Nanotechnology and nanomedicine applications in parasitic diseases. **Parasitologists United Journal**, PUJ, 3(1-2): 19-26, 2010.

ESPIR, T. T. et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology**, 167, 1-6, 2016.

ESLAMI, Z.; TANNER, C.E. Time course and intensity of infection *in vitro* in the resident peritoneal macrophages of resistant and susceptible mice exposed to different doses of *Leishmania donovani* promastigotes. **Int J Parasitol** 24: 743-747, 1994.

FAGUNDES SILVA, G. A. et al. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 110(6): 797-800, 2015.

FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg Med Chem**, 17: 2950-2962, 2009.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology**, 2014.

FERREIRA, P.M.P. et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **An Acad Bras Cienc**, 83: 1373-1384, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652011000400024>. Acesso em: 14 abril 2016.

FERNÁNDEZ, M.M.; MALCHIODI, E.L.; ALGRANATI, I.D. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells.

Antimicrob. Agents Chemoter, v.55(1), p.86-93. 2011. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/55/1/86.full>>. Acesso em: 16 março 2016.

FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S. O gênero *Leishmania* e as leishmanioses. In: **Fundamentos da Parasitologia Humana**. 1. ed, Manole. Barueri, São Paulo, c. 5, p. 37-46, 2003.

FIERASCU, R.C.; ION, R.M.; DUMITRIU, I. **Plasmonic Materials for Biomedical Applications**. In: 6th Workshop on European Scientific and Industrial Collaboration on promoting Advanced Technologies in Manufacturing. WESIC'08; Bucharest, Romania, 2008.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio, **Quim. Nova**, v. 28, n.3, 511-518, 2005.

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., FERREIRA, C. S., COSTA, M. A. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemoter**, v. 45 (3), p. 913-6, 2001.

FRÉZARD F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, 30;14(7):2317-36, 2009.

FRAGA, V.F. **Derivatização da Pentamidina**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. 2007.

FURTADO, T.; VALE, E. C. S. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An Bras Dermatol**, 80(4):421-8, 2005

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Res in Microbiol**, v. 155: 244-230, 2004.

FURUSAWA, G. P.; BORGES, M. F. Colaboração para o conhecimento do histórico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil: possíveis casos entre escravos na vila de Vassouras-RJ, nos anos 1820 a 1880. **Rev Patol Trop**, v. 43 (1): 7-25, 2014.

FVS. Fundação de Vigilância Sanitária. Amazonas, 2015. **Indicadores de Morbidade – AM**, (www.fvs.am.gov.br). Acesso: 15/08/2015.

GARBÓS, S.; BULSKA, E.; HULANICKI, A. Spectrochim. **At Spectrosc**, 21:128-131. 2000.

GENARO, O.; REIS, A. B. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. In: NEVES, D. P. et al. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu, p. 47-66. 2005.

GARNIER, T.; CROFT, S.L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. **Curr Opin Investig Drugs**, 3: 538–544, 2002.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(1): 71-80, 2003.

GONZALEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane database Syst. Rev. England*, (2):CD004834, 2009.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(4):419-33, 2010.

GLUCANTIME®: Antimoniato de Meglunima. São Paulo: Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Farm. Resp.: Silvia Regina Brollo - CRF - SP nº 9.815. **Bula de remédio.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=991282015&pIdAnexo=2435258.

GUIMARÃES, L. H. et al. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. *Gaz. méd. Bahia*, 75:1, p:66-74, 2005.

GUIMARÃES, V. C. F. V. **Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco.** 2011. 70f. Dissertação (Mestrado), Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Pernambuco, Recife.

GRIMALDI JR., G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41:687-725, 1989.

GUERRA, J.A.O. et al. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5): 587-590. 2003.

GUERRA, J.A.O.; RIBEIRO, J. A. S.; CAMARA, L. I. A. R. C.; BARBOSA, M. G. V.; PAES, M. G. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, *Brasil. Cad. Saúde Pública*, v. 22 (11), 2006.

GUERRA, J. A.; et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 5, e980, 2011.

GUTIERREZ, V.; et al. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. *Chem. Soc. Rev.*, 45, 152-158, 2016.

GUIZANI, M. M. et al. Leishmaniasis. *Encyclopedia of Environmental Health*. p. 453-480. 2011.

HAIMEUR, A. et al.; Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (Sb III) resistant *Leishmania tarentolea*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 108, 131-135, 2000.

HARTGERS, F.C.; YAZDANBAKHS, M. Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. *Parasite Immunol.*, 28(10):497-506, 2006.

HOLTZ, R. D. **Desenvolvimento, caracterização e mecanismos de ação de nanopartículas para uso em terapias químicas (quimioterapia)**. 2009. Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP, São Paulo.

HOTEZ, P.J. et al.; Control of Neglected Tropical Diseases. **N Engl J Med**, 357: 1018-1027. 2007.

IIJIMA, S. Nanotubos de Carbono. **Nature**, 354, 56.1991.

INOCENCIO DA LUZ, R. et al. Drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolates from Brazilian HIV-positive and HIV-negative patients. **J. Ant. Chemother**, v.66, n.3, p. 677-679, 2011.

IRAJI, F.; SADEGHINIA, A. Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. **Ann Trop Med Parasitol**, 99(1):3-9, 2005.

JAFFE, C.; BENNETT, E.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MCMAHON-PRATT, D. Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immunodiagnosis, 13. **J. Immunol.**, 133:440-447, 1984.

JAIN, G.K. et al. Microscopic and spectroscopic evaluation of novel PLGA-chitosan Nanoplexes as na ocular delivery system. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, vol. 82, n.2, p. 397-403, 2011.

JAIN, K., JAIN, N.K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, 18, 23–24, 2013.

JEBALI, A. et al. Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation. **Drug Chem Toxicol.**, 37(4):400-9. 2014.

JEBALI, A.; KAZEMI. B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicol In Vitro.**, 27(6):1896-904, 2013.

JOHN, B.; HUNTER, C. A. Neutrophil soldiers or Trojan horses? **Science**, 321: 917-918. 2008.

KHALIL, N .M.; et al. Nanotechnological strategies for the treatment of neglected diseases. **Curr. Pharm. Des.**, 19, 7316–7329, 2013.

KLABUNDE, K. J. **Nanoscale Materials in Chemistry. Wiley Interscience**: New York, 2001.

KUAN, C-Y. et al. Nanotech: propensity in foods and bioactives. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 52:55–71. 2012.

KROLEWIECKI, A. et al. Activity of azithromycin against *Leishmania major* *in vitro* and *in vivo*. **Am J Trop Med Hyg.**, 67: 273-7. 2002;. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408666>>. Acesso em: 14 março 2016.

KUBIK, T.; BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M. Nanotechnology on Duty in Medical Applications. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 6, 17-33, 2005.

KUMAR, A. et al. Nanotechnology: a review. **J Pharm research**, v.5, p. 3630-34. 2012.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond, Serie B** 321: 389-404, 1988.

LAINSON, R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the Neotropics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 92, 377–387, 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds. *Biology of the Kinetoplastida*. New York, **Academic Press**. 1-116, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New world Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. **Microbiology and Microbial Infections** (9^a ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; ISHIKAWA, E.A.Y. Cutaneous *Leishmaniasis* of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, 65: 282-284, 1990.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEM, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, 213: 183-191. 2008.

LIMA, E.B. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 82:111-24. 2007.

LIU, D.; UZONNA, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 2,n.83. 2012.

LOGOTHETIDIS, S. Nanotechnology in medicine: The medicine of tomorrow and nanomedicine. **Hippokratia**, 10:7–21. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_hiv_coinfection5.pdf>. Acesso em: 11 junho 2016.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**. 15;46(2):223-31, 2008.

LUCUMI, A.; ROBLEDO, S.; GAMA, V.; SARAVIA, N. G. Sensitivity of *Leishmania (Viannia) panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42:1990-1995, 1998.

MACHADO, P.R.L. et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clin Infect Dis. United States**; 44(6):788–93.2007.

MACHADO, P.R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, L.H. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Negl Trop Dis**, 4: e912, 2010.

MALTEZOU, H.C. Drug resistance in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Biom. And Biotech**.2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/617521/>>. Acesso em: 13 março 2016.

MANSUETO, P. et al., Leishmaniasis in travelers: A literature review, **Travel Medicine and Infectious Disease**, xx, 1-19, 2014.

MARZOCHI, Mauro Célio de A.; MARZOCHI, Keyla Belízia F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 10, supl. 2, p. S359-S375, 1994 .

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis ("Espundia", Escamel, 1911). **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 80: 859-76, 1986.

MELO, J.R. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Quím. Nova**.v.35, n.9, p.1872-1878. 2012.

MENEGUETTI, D.U.O.et al. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Rev Ciênc Farm Básica Apl** 35: 577-587. 2014. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/3741/3741>. Acesso em: 17 abril 2016.

MEARS, E.R.; MODABBER, F.; DON, R.; JOHNSON, G.E. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** 9(9): e0003889, 2015.

MIRANDA, L.F.C. **Sensibilidade ao Antimonial Pentavalente in vitro de amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas antes e após o tratamento de pacientes com falha terapêutica**.Dissertação (Mestrado em pesquisa clínica em doenças infecciosas), 2011.

MICROMEDEX® 2.0. Truven Health Analytics, Greenwood Village, Colorado, USA.

MOHANPURIA, P.; RANA, N.K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **J Nanopart Res**, 10:507–517, 2008. DOI 10.1007/s11051-007-9275-x.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. **FASEB J.**, 19(3):311-30, 2005.

MOHEBALI, M.; et al.; Nanosilver in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/-IR/75/ER): an in vitro and in vivo study. **J. Fac. Pharm.**, 17, 285–289, 2009.

MOMENI, A.Z; AMINJAVAHERI, M. Successful treatment of non-healing cases of cutaneous leishmaniasis, using a combination of meglumine antimoniate plus allopurinol. **Eur J Dermatol.** 2003;13:40-3. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12609780>>. Acesso em: 13 Abril de 2016.

MOURA, F.J.D. et al. Pentoxifylline prevents the meglumine antimonate-induced renal toxicity in rats, but not that induced by the inorganic antimony pentachloride. **Toxicology** 243: 66-74, 2008.

MOTA, L.A.A.; MIRANDA, R.R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arq. Int. Otorrinolaringol**, v.15, n.3, p. 376-381. 2011.

MURRAY, H.W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. **J Exp Med**, 153: 1302-1315. 1981.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet.**, 4;366(9496):1561-77, 2005.

NAIFF JUNIOR, R. D. et al. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Rio Preto Da Eva, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical** , vol. 38 (2): 103-114, 2009.

NEGRÃO, G.N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a dispersão da Leishmaniose Tegumentar Americana nas Américas. **Revista Percorso – NEMO**, v. 1, n. 1 , p. 85-103, 2009.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NICOLLE, G.L. Culture du parasite du Bouton d'Orient. **C.R.Acad. Sci.**, 146: 842-843. 1908.

NIKOBAKHT, B.; EL-SAYED, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. **Chemistry of Materials**, 15 (10), 1957-1962. 2003.

NOVY, F.G.; McNEAL, W.J. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. **J. Infect. Dis.**, 1: 1-30. 1904.

OLIVEIRA, P.R.S. **Modulação da ativação de macrófagos e agravamento da infecção em modelo murino de leishmaniose tegumentar por moléculas de**

leishmania (Leishmania) amazonensis. 2010. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em biotecnologia em saúde e medicina investigativa.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Report of the Fifth Consultative**.2012.Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en> Acesso em: 26 fevereiro 2015.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of Leishmaniasis**. Sixtieth World Health Assembly, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_60.13_Eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 20 janeiro 2017.

OPAS PAHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**. Report Leishmaniasis, nº 3, 2015.

OURIVES-NEVES, L. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol**, 86(6):1092-101. 2011

OPAS. Organización Panamericana de la Salud. **Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento**.Washington, D.C.: OPS, 2013.

PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect.**, 69: 1:S10-8. 2014.

PALACIOS, R. et al. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. **Am J Trop Med Hyg.**, 64(3-4):187-93. 2001.

PRATLONG, F. et al. 2002. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania naiffi* is widespread in South America. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, 96:781-785.

PENNA, G.O. et al. Doenças dermatológicas de notificação compulsória no Brasil.**Anais Brasileiros de Dermatologia**. 86: 5: 865-877. 2011.

PELLISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; LIMA JÚNIOR, F. E. F. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 20(1):107-110, 2011.

PESSOA, S. B.; BARRETO, M. P.. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional/São Paulo: Serviço de Parasitologia, Departamento de Medicina, Faculdade de São Paulo, 1948.

PETERS, N.C. et al. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, 321:970-974. 2008.

PETERS, C.P.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, 11(9), 1290-1296. 2009.

PIMENTEL, L. F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 43, n. 4. 2007.

PIMENTEL, F.G. et al. The leishmania-macrophage interactions: role of E-NTPDases and purinergic signaling. **Macrophage**, 3: e1143. 2016.

PINHEIRO, F.G.; LUZ, L.S.B.; FRANCO, A.M.R. Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, 38: 165-172, 2008.

PRATA, A. et al. Eficácia da azitromicina no tratamento da leishmaniose cutânea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.1, p.65-69, 2003. Disponível em: < www.scielo.br/pdf/rsbmt/v36n1/15309.pdf>. Acesso em: 13 de Março de 2016.

PRAHU, P.; PATRAVALE, V.; JOSHI, M. Nanocarriers for effective topical delivery of anti-infectives. **Curr. Nanosci.**, 8, 491–503, 2012.

PUNTES, S.M.; SACKS, D.L.; JOINER, K.A. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **J Exp Medical**; 167: 887- 902. 1988.

RANGEL, E.; LAINSON, Ralph. **Flebotomíneos do Brasil**. (org.). Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, 2003. 368 pp.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **The Journal of Immunology**, 179(6): 3988-3994. 2007.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M.J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. **Expert Opin Drug Deliv.**, 5(7):805-23, 2008.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, São Paulo, 60(2), 54-57. 2008.

ROSSI-BERGMANN, B. et al. Therapeutic Potential of Biogenic Silver Nanoparticles in Murine Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Nano Research** (Online), v. 20, p. 89-97, 2012.

SACKS, D.L.; BROCLIN, N.T.; TURCO, S.J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, 42: 225-234. 1990.

SAMPAIO, R.N.R; LUCAS, Í.C; FILHO, A.V.C. O uso da associação azitromicina e N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania*

(Leishmania) amazonensis em camundongos C57BL6. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.84,p. 125- 128, 2009.

SANTOS, R.V.; COIMBRA, J.R.C.E.A. **Saúde e Povos Indígenas**. Rio de Janeiro: 1994, Ed. FIOCRUZ; 1994.

SANTOS, D.O, et al. Leishmaniasis treatment a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**,103(1):1-10. 2008.

SANTOS, R.F. et al. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on Trypanosoma cruzi Infectivity and Virulence. **PLoS Neglect Trop D**, 3:e387. 2009.

SANTOS, E.P. **Determinação de espécies de arsênio, antimônio e chumbo em antimoniato de meglumina por espectrometria de absorção atômica após extração em fase sólida**.2006. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria.

SEIFERT, K. et al. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. **Int J Antimicrob Agents**, 30: 229- 235, 2007.

SERENO, D., HOLZMULLER, P., MANGOT, I., CUNY, G., OUAISSI, A., LEMESRE, J. L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45 (7), p. 2064-9, 2001.

SERENO, D.; et al. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob. Agents Chemother**, 42, 3097, 1998.

SHAKED-MISHAN, P.; et al. Novel Intracellular Sb^V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 276 (6), p. 3971-6, 2001.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SILVEIRA, F.T. et al. **Leishmaniose Visceral Americana**. In: LEÃO, Raimundo Nonato Queiroz de. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Cejup UEPA, Instituto Evandro Chagas, 1997, 886 p.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 99: 239-251, 2004.

SILVEIRA, F.T. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**,v.22 (1), 2008.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>>. Acesso em: 30 set 2015.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Casos de Leishmaniose Tegumentar**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>>. Acesso em: 20 Janeiro 2017.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R.K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 485-497, 2012.

SINGH, O.P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, 5:19. 2016.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of leishmania infantum-infected Dogs. **J. Comp. Pathol.**, v.130, p.7-12, 2004.

SOTO, J.; et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis.**;38:1266-72. 2004.

SOTO, J.; et al. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, 78:210-1, 2008.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes, **J. Biol Chem**, 278 (27): 25120-25132, 2003.

SHUKLA, A.K.; PATRA, S.; DUBEY, V.K. Nanospheres Encapsulating Anti-Leishmanial Drugs for Their Specific Macrophage Targeting, Reduced Toxicity, and Deliberate Intracellular Release. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 12(11): 953–960, 2012.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother.**, 16(2):237-52. 2015.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop Med Int Health**. 6(11):849-54, 2001.

SUNDAR, S.; MURRAY, H.W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. **Bull World Health Organ**, 83:394–5, 2005.

SURI, S. S.; FENNIRI, H.; SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, 2:16, 2007.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2, **J. Immunol. Methods** 93: 157-165, 1986.

TALHARI, S. et al. Leishmaniose no Estado do Amazonas - Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 63(6): 433-438, 1988.

TEMPONE, A.G. et al. Targeting *Leishmania chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **J. Antimicro. Chemo.**, 54, 60-68. 2004.

THE ROYAL SOCIETY; THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies**, 2004.

TOLOSA, E.M.C. et al. **Manual de técnicas histológicas para histologia normal e patológica**. 2 ed. Barueri: Manole, 2003, 331p.

TUON, F.F. et al. Treatment of New World cutaneous Leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. **Int J Dermatol.**, 47(2):109-24. 2008.

VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An Bras Dermatol.**, 80(4):421-8. 2005.

VALCÁRCEL, M.; LÓPEZ-LORENTE, Á. Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry. 1st ed. **Elsevier B.V.**; 2014.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J Immunol**, 173:6521-6525. 2004.

VERONESI, R.; Focaccia, R. **Tratado de Infectologia** - 2 Vols. - 5ª Ed. 2015. Editora Atheneu.

VILLA, M.F.L. **New pharmacological strategy based in nanotechnology against cutaneous leishmaniasis in Ecuador**. 2010. Tesis de grado (Magister en Microbiología) Universidad San Francisco de Quito.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of leishmaniases**: Report of WHO expert committee. *Technical report series 793*. Geneva; 1990.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Library Cataloguing-in-Publication Data: **Control of the leishmaniases**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26, 2010.

WYLLIE, S., CUNNINGHAM, M. L., FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 279 (38), p. 39925-32, 2004.

YARDLEY, V.; CROFT, S.L. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**. 41(4):752-6, 1997.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America


(Diptera: Psychodidae). Florida, **Memoirs of the American Entomological Institute 54, Associated Publishers**, 881p., 1994.

ZAULI-NASCIMENTO, R.C. et al. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Trop Med Int Health.**, 15(1):68-76, 2010.

ZANCHETA, B. **Sistema nanoestruturado lipossomal contendo chalcona ch8 para o tratamento da leishmaniose cutânea.**2009. 220f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

ZHOU, L. et al. Impact of Human Granulocyte and Monocyte Isolation Procedures on Functional Studies. **Clin Vaccine Immunol**,19(7): 1065–1074, 2012.

ANEXO A – Formulário de Solicitação de Autorização para Uso de Animais

 INPA INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS	FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO
Protocolo n. <u>09/2015</u> Em: <u>23</u> / <u>03</u> / <u>2015</u> às <u>16:39</u> Recebido por: <u>[Assinatura]</u>	USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO PROTOCOLO Nº _____ RECEBIDO EM: ____ / ____ / ____

Prezado pesquisador / professor: Este formulário tem o intuito de colher informações para atender a Lei Arouca 11794/2008 a qual determina que as CEUAS devem "examinar **previamente** os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável". De acordo com a Lei Arouca (11794/2008 art 10 § 5º) o **segredo científico e/ou industrial** das informações apresentadas a esta CEUA será resguardado. A fim de evitar pendências desnecessárias procure ler e responder atentamente ao formulário.

TERMO DE RESPONSABILIDADE - LEIA CUIDADOSAMENTE ANTES DE ASSINAR

Eu, Fabiane Veloso Soares, certifico que:

- li o disposto na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Assinatura do responsável: Fabiane Veloso Soares
 Data: 23 / 03 / 2015

Ciente do orientador —somente para mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos e bolsistas
 Assinatura: Antônia Maria Ramos Franco Pereira, Ph.D.
 Pesquisador Titular 3
 Matrícula: 1213035
 INPA/MCTI

Entregar os documentos abaixo, **tanto em forma impressa quanto em forma digital (CD)**, na Assessoria de Apoio aos Órgãos Colegiados – ASCOL:

- Formulário preenchido com todas as páginas rubricadas e assinado (tanto na versão impressa quanto na digital). No caso de projetos a serem desenvolvidos por estudantes de iniciação científica, o formulário deve ser assinado pelo orientador. No caso de projetos a serem desenvolvidos por mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos e bolsistas, o formulário deve ser assinado pelo estudante/bolsista com ciência do orientador/supervisor;
- Cópia do projeto de pesquisa completo;
- Declaração da aprovação do mérito científico do projeto no caso de projeto de programa de pós-graduação ou Iniciação Científica. Esta declaração deve ser emitida pelo respectivo programa ao qual o estudante está vinculado.
- Cópia da autorização de coleta/transporte do SISBIO no caso de animais silvestres.

CEUA – ASCOL – INPA 1 Formulário Versão Fev/2014

ANEXO B – Parecer Final do CEUA

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

RECOMENDAÇÃO FINAL

INDICAÇÃO: Aprovado

DATA DE LIBERAÇÃO DO PARECER: 10.09.2015

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink that reads 'George H. Rebelo'.

George Henrique Rebelo
Presidente CEUA-INPA
PO n. 079/2015