

VIVIANE MEDEIROS SILVA

Eficácia da associação de medicamentos orais e tópico no tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos BALB/c.

Brasília, 2022.

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

VIVIANE MEDEIROS SILVA

Eficácia da associação de medicamentos orais e tópico no tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos BALB/c.

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.

BRASÍLIA

2022

VIVIANE MEDEIROS SILVA

Eficácia da associação de medicamentos orais e tópico no tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos BALB/c.

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio – Presidente

Universidade de Brasília - UnB

Ada Amália Ayalla Urdapilleta

Secretaria de Saúde do Distrito Federal - SESDF

Ciro Martins Gomes

Universidade de Brasília - UnB

Renata Velôzo Timbó

Universidade de Brasília - UnB

*Dedico este trabalho às vidas dos animais que foram doadas para que  
outras vidas sejam poupadas no futuro.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por erguer-me diante das tribulações, por sempre me mostrar que os desafios existem para serem superados, e principalmente por toda a proteção até aqui. Toda honra e toda glória a ti Senhor!

À minha mãe, Lúcia Maria de Medeiros Silva e ao meu pai, José Ribeiro da Silva, por todo o apoio e incentivo durante a minha jornada de vida, e principalmente por permitirem que eu realize os meus sonhos diários.

À Universidade de Brasília por mais uma vez oportunizar-me com valiosos aprendizados, e à Pós-graduação em Ciências da Saúde pelo privilégio de compor o corpo discente do seu programa.

Agradeço aos animais que participaram deste estudo, pois sem eles nada seria possível. Cada vida foi muito importante e tratada com muito respeito.

Agradeço à Laís Sevilha dos Santos pela parceria incondicional antes, durante e após a realização dos experimentos. Obrigada por contribuir exemplarmente para que tudo fosse feito com cuidado, respeito e responsabilidade. Choramos, sorrimos, comemoramos, aprendemos, ensinamos, e acima de tudo, nos divertimos muito. Obrigada por ajudar-me a escrever mais esse capítulo da minha história.

Agradeço à Jaqueline Osiro Bergmann por todo o apoio na execução da parte experimental deste trabalho, por ser tão cuidadosa, organizada, responsável, companheira e incentivadora.

Agradeço ao Professor Marcelo Oliveira Rodrigues, e à Carime Vitória da Silva Rodrigues, pela parceria, confiança e pela oportunidade em fazer parte do “projeto C-dots”, que é tão inovador e importante para o meio científico. Trabalhar com os dois foi inspirador e empolgante! Obrigada pela primeira patente.

Agradeço à Professora Sarah Silva Brum e à Ana Caroline Martins Vieira, pela oportunidade de fazer parte de testes promissores com a *Magonia pubescens*.

Meu carinho especial à Shirley Claudino Pereira Couto, e à Mariângela Souza de Oliveira, pela disposição em ajudar em parte dos experimentos com seus conhecimentos valiosos em imunologia. Nosso trabalho continua após a defesa. Estaremos juntas, na vida e nas publicações.

Agradeço à Marinete de Souza Sampaio e à Maria Solange Carvalho Santos, que realizam muito além da limpeza do laboratório, pois renovam o ambiente com

muita alegria e disposição. Obrigada pelas conversas, pelo cuidado e preocupação durante todos esses anos.

Agradeço ao Laboratório Sabin pela parceria na realização dos exames sanguíneos dos animais.

Agradeço imensamente ao Professor Ciro Martins Gomes pelo apoio, incentivo, por confiar no meu trabalho e por permitir que eu tenha participado de forma ativa de tantos projetos de pesquisa durante o período do doutorado. Foram experiências valiosas e enriquecedoras que farão diferença além da minha vida acadêmica.

Agradeço à Professora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho. Durante os anos de convivência reforcei ainda mais que quando se deseja algo, a impossibilidade não existe. Obrigada por isso.

*“Não há diferenças fundamentais entre o homem e os animais nas suas faculdades mentais (...) os animais, como os homens, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento”.*

*(Charles Robert Darwin)*

## RESUMO

A busca por tratamento da LTA com drogas de fácil administração, baixa toxicidade e com maior eficácia terapêutica é o objeto de estudos que visam à cura da doença. A falta de resposta em alguns casos e os efeitos adversos geraram a necessidade de uso das drogas de segunda linha, do reposicionamento de fármacos, de terapias tópicas, e de associação de medicamentos, a fim de aumentar a eficácia do tratamento. Diante desse cenário, o **objetivo** deste trabalho foi avaliar a eficácia, efeitos adversos e ação imunomoduladora da associação da miltefosina (M) com a pentoxifilina (P) orais e da terapia fotodinâmica com hidrogel de *Magonia pubescens* carregado com C-dots (TFD) no tratamento da LC em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis*. Para isso, a **metodologia** baseou-se em estudo experimental *in vivo*, no qual foram utilizados 54 camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus* divididos em nove grupos, e tratados com as seguintes terapias e associações: M, P, TFD, M+P, P+TFD, M+TFD e MPTFD. Os critérios de avaliação de eficácia foram aspirados das lesões, pesquisa de amastigotas, diluição seriada e MTT, quantificação de parasitos por qPCR, medição de patas, pesagem de animais, exames bioquímicos e imunológicos. Os **resultados** demonstraram que a associação M+P+TFD, foi relativamente satisfatória. A associação P+TFD parece ser mais eficaz que o tratamento apenas com P, e estatisticamente semelhante ao tratamento com TFD. A miltefosina isolada, parece ser mais eficaz quando comparada aos outros tratamentos. A pentoxifilina isolada apresentou resultados semelhantes ao grupo CP. A TFD parece ter maior eficácia do que o tratamento com pentoxifilina. A qPCR mostrou-se eficiente para quantificar o número de parasitos. A associação P+TFD, no que tange à produção de óxido nítrico, apresentou relevância significativa e influência imunomoduladora, no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Em **conclusão**, ressalta-se a importância da associação de drogas e novas metodologias, visto que alguns resultados podem se tornar opção de tratamento. Entretanto, trabalhos futuros são necessários, utilizando um número maior de animais para que as terapias possam ser analisadas mais detalhadamente.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose cutânea; Terapia Fotodinâmica; C-dots; Carbon Dots; hidrogel; miltefosina; pentoxifilina; *Magonia pubescens*.



## ABSTRACT

The search for treatment of ATL with drugs of easy administration, low toxicity and with greater therapeutic efficacy is the object of studies aimed at curing the disease. The lack of response in some cases and the adverse effects generated the need to use second-line drugs, drug repositioning, topical therapies, and drug combinations in order to increase the effectiveness of the treatment. Given this scenario, the **objective** of this study was to evaluate the efficacy, adverse effects and immunomodulatory action of the association of oral miltefosine (M) with pentoxifylline (P) and photodynamic therapy with *Magonia pubescens* hydrogel loaded with C-dots (PDT) in the treatment of CL in BALB/c mice infected with *L. (V.) braziliensis*. For this, the **methodology** was based on an in vivo experimental study, in which 54 female mice of the *Mus musculus* species were divided into nine groups and treated with the following therapies and associations: M, P, PDT, MP, PTFD, MTFD and MPTFD. Efficacy evaluation criteria were aspirated from lesions, investigation of amastigotes, serial dilution and MTT, quantification of parasites by qPCR, measurement of paws, animal weighing, biochemical and immunological tests. The **results** showed that the MPTFD association was relatively satisfactory after six days of treatment. PTFD combination appears to be more effective than P-only treatment, and also appears to be more effective than PDT-only treatment. The MP combination appears to be more effective than miltefosine alone. Pentoxifylline alone showed similar results to the CP group. PDT appears to be more effective than pentoxifylline treatment. qPCR proved to be efficient to quantify the number of parasites. The association P+PDT, regarding the production of nitric oxide, showed significant relevance and immunomodulatory influence, in the treatment of BALB/c mice infected with *L. braziliensis*. In **conclusion**, the importance of the association of drugs and new methodologies is emphasized, given the possibility of increasing the chances of cure in ATL. However, it is recommended in future works the comparison of the MTT technique in relation to qPCR, in order to reassess whether the reduced number of animals may have influenced different results, especially with regard to the sensitivity of the method.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis; Photodynamic Therapy; C-dots; Carbon Dots; hydrogel; miltefosine; pentoxifylline; *Magonia pubescens*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Fluxograma do estudo.

**Figura 2** - Camundongo BALB/c marcado com dois traços na cauda para identificação no grupo.

**Figura 3** - Imagem da câmara de Neubauer com esquema de ampliação dos quadrantes utilizados para contagem dos parasitos.

**Figura 4** - Realização de aspirado na pata traseira direita de um camundongo BALB-c para confirmação da infecção por *L. (V.) braziliensis*.

**Figura 5** - Lâminas contendo os esfregaços para pesquisa de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* coradas com *Giemsa*.

**Figura 6** - Agulha de gavagem para alimentação de camundongos.

**Figura 7** - Administração de fármacos em camundongos por via orogástrica. A. a seta em vermelho destaca a droga dentro da seringa antes da sua aplicação. B. a seta em vermelho demonstra que a droga foi inserida na cavidade bucal do camundongo.

**Figura 8** - Instrumento utilizado para aplicação da TFD nas patas infectadas dos camundongos.

**Figura 9** - Ilustração do funcionamento do instrumento utilizado para aplicação da TFD nas patas infectadas dos camundongos.

**Figura 10** - Imagens da aplicação da TFD nas patas infectadas dos camundongos. A. visão plantar da pata do camundongo. B. visão palmar da pata do camundongo.

**Figura 11** - Ilustração do método de dissecação da pata do camundongo. A. retirada da pele com auxílio da lâmina de bisturi. B. pata exposta após completa dissecação.

**Figura 12** - Ilustração do método de maceração das patas dos camundongos. Detalhe da seta apontando o fundo do macerador onde as patas foram depositadas.

**Figura 13** - Metodologia da diluição seriada. A. ilustração da transferência de soluções entre os poços com a pipeta multicanal. B. ilustração da metodologia com representação do Volume Inicial (V.I.), Volume Final (V.F.), quantidade transferida de uma linha para outra.

**Figura 14** - Demonstração da metodologia utilizada para medição das patas infectadas. A. medição lateral. B. medição superior e inferior.

**Figura 15** - Curva padrão construída com *L. (V.) braziliensis*, demonstrando a média dos Cq da diluição seriada.

**Figura 16** - Curva de referência composta pelos números absolutos de leishmânias em cada ponto da diluição da curva padrão, valores de Cq e Tm.

**Figura 17** - Quantificação das amostras dos grupos de tratamento por meio da qPCR com valores absolutos do número de leishmânias no D7 e no D13.

**Figura 18** - Avaliação do efeito da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*. Percentual de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos, média corpuscular e índice corpuscular. Dia 7- Miltefosina; Dia 7 - Pentoxifilina; Dia 7 - TFD. Nenhum valor de p foi menor 0,05 (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

**Figura 19** - Avaliação do efeito da associação da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*. Dia 7- Miltefosina + Pentoxifilina; Dia 7 - Pentoxifilina + TFD; Dia 7 - Miltefosina +TFD; Dia 7- Miltefosina + Pentoxifilina + TFD. Nenhum valor de p foi menor 0,05, (teste Kruskal-Wallis,

seguido pelo método de Dunn;). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

**Figura 20** - Avaliação do efeito da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*. Percentual de macrófagos apresentando lipídicos, média corpuscular e índice corpuscular. Dia 7 - Miltefosina; Dia 7 - Pentoxifilina; Dia 7 - TFD. Nenhum valor de p foi menor 0,05 (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

**Figura 21** - Avaliação do efeito da associação da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*. Dia 13 - Miltefosina + Pentoxifilina; Dia 13 - Pentoxifilina + TFD; Dia 13 - Miltefosina + TFD. Nenhum valor de p foi menor 0,05 (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn;). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

**Figura 22** - Avaliação do efeito da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, concentração expressa em  $\mu\text{M}$ . Dia 7 - Miltefosina,  $p = 0,5647$ ; Dia 7 - Pentoxifilina,  $p = 0,3679$ ; Dia 7 - TFD,  $p = 0,5647$ , Dia 13 - Miltefosina,  $p = 0,1653$ ; Dia 13 - Pentoxifilina,  $p = 0,5647$ ; Dia 13 - TFD,  $p = 0,1017$ , (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

**Figura 23** - Avaliação do efeito da associação da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, concentração expressa em  $\mu\text{M}$ . Dia 7 - Miltefosina + Pentoxifilina,  $p = 0,7528^2$ ; Dia 7 - Pentoxifilina + TFD,  $p = 0,6514^1$ ; Dia 7 - Miltefosina + TFD,  $p = 0,8220^2$ , Dia 7 - Miltefosina + Pentoxifilina + TFD,  $p = 0,6864^2$  (<sup>1</sup>teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; <sup>2</sup>ANOVA, seguido pelo método de Tukey). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

**Figura 24** - Avaliação do efeito da associação da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, concentração expressa em  $\mu\text{M}$ . Dia 13 - Miltefosina + Pentoxifilina,  $p = 0,1653^1$ ; Dia 13 - Pentoxifilina + TFD,  $p = 0,0245^2$ ; Dia 13 - Miltefosina +TFD,  $p = 0,1653^1$  (<sup>1</sup>teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; <sup>2</sup>ANOVA, seguido pelo método de Tukey). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Reagentes e sistemas utilizados para o preparo do meio NNN modificado.

**Tabela 2** - Reagentes e sistemas utilizados para o preparo do meio Schneider.

**Tabela 3** - Sistema utilizado para a amplificação do primer PPr e PPf.

**Tabela 4** - Sistema utilizado para a amplificação do primer PPr e PPf.

**Tabela 5** - Confirmação da infecção dos animais por meio da pesquisa direta de amastigotas em esfregaços contendo exsudato das patas traseiras direitas dos animais.

**Tabela 6** - Resultados da qPCR realizada a partir de amostras de papel filtro para confirmação da infecção.

**Tabela 7** - Resultados das leituras dos esfregaços de pesquisa de amastigotas como critério de avaliação de eficácia no D7.

**Tabela 8** - Resultados das leituras dos esfregaços de pesquisa de amastigotas como critério de avaliação de eficácia no D13.

**Tabela 9** - Análise estatística dos resultados do MTT durante o D7 de tratamento.

**Tabela 10** - Análise estatísticas dos resultados do MTT durante no D13 de tratamento.

**Tabela 11** - Resultados da medição do diâmetro (mm) lateral das patas dos camundongos nas etapas de inoculação, 30 dias após a inoculação, D1, D6 e D12 de tratamento.

**Tabela 12** - Resultados da medição do diâmetro (mm) superior/inferior das patas dos camundongos nas etapas de inoculação, 30 dias após a inoculação, D1, D6 e D12 de tratamento.

**Tabela 13** - Resultados das pesagens (g) dos camundongos por grupo nas etapas de inoculação, 30 dias após a inoculação, D1, D6 e D12 de tratamento.

**Tabela 14** - Resultados das médias das pesagens dos camundongos por grupo nas etapas de inoculação, 30 dias após a inoculação, D1, D6 e D12 de tratamento.

**Tabela 15** - Resultados da quantificação do DNA de *Leishmania braziliensis* das amostras dos macerados das patas dos camundongos por grupos de tratamento e período de eutanásia.

**Tabela 16** - Resultados das análises bioquímicas das amostras dos grupos de tratamento no D7.

**Tabela 17** - Resultados das análises bioquímicas das amostras dos grupos de tratamento no D13.

**Tabela 18** - Resultados da quantificação dos corpúsculos lipídicos sensibilizados com LPS no D7 demonstrando o índice corpuscular, a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma e a média de corpúsculos dentro dos macrófagos.

**Tabela 19** - Resultados da quantificação dos corpúsculos lipídicos no D7 demonstrando o índice corpuscular, a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma e a média de corpúsculos dentro dos macrófagos.

**Tabela 20** - Resultados da quantificação dos corpúsculos lipídicos sensibilizados com LPS no D13 demonstrando o índice corpuscular, a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma e a média de corpúsculos dentro dos macrófagos.

**Tabela 21** - Resultados da quantificação dos corpúsculos lipídicos no D13 demonstrando o índice corpuscular, a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma e a média de corpúsculos dentro dos macrófagos.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BHI</b>	Brain Heart infusion Agar
<b>C-dots</b>	Carbon quantum dots
<b>CEMIB</b>	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
<b>CN</b>	Controle Negativo
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>CP</b>	Controle Positivo
<b>DF</b>	Distrito Federal
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
<b>ELDA</b>	Extreme Limiting Dilution Analysis
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção enzimática)
<b>FM</b>	Faculdade de Medicina
<b>GRP-UnB</b>	Comissão de Gerenciamento, Tratamento e Destinação de Resíduos Perigosos da Universidade de Brasília
<b>HEPES</b>	Ácido Hidroxietil Piperazinoetanosulfônico
<b>HUB</b>	Hospital Universitário de Brasília
<b>IC</b>	Índice Corpuscular
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose difusa
<b>LD</b>	Leishmaniose disseminada
<b>LIMA</b>	Laboratório de Inorgânica e Materiais
<b>LM</b>	Leishmaniose mucosa
<b>LMC</b>	Laboratório de Materiais e Combustíveis
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>M</b>	Miltefosina
<b>MBAam</b>	N'N'-Metileno-bis-acrilamida
<b>MCL</b>	Quantidade Média de Corpúsculos dentro dos Macrófagos
<b>MØ%</b>	Porcentagem de Macrófagos apresentando Corpúsculos Lipídicos no Citoplasma
<b>MP</b>	Miltefosina e Pentoxifilina

<b>MPTFD</b>	Miltefosina, Pentoxifilina e Terapia Fotodinâmica
<b>MTFD</b>	Miltefosina e TFD
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
<b>NMG</b>	N-metil glucamina
<b>NMT</b>	Núcleo de Medicina Tropical
<b>NNN</b>	McNeal, Novy e Nicolle
<b>Oil Red O</b>	Coloração com Óleo Vermelho O
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ON</b>	Óxido Nítrico
<b>P</b>	Pentoxifilina
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PTFD</b>	Pentoxifilina e Terapia Fotodinâmica
<b>qPCR</b>	PCR em tempo real
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SbV</b>	Antimonial Pentavalente
<b>SFB</b>	Fetal Bovine Serum
<b>STF</b>	Salina Tamponada com Fosfato
<b>TFD</b>	Terapia Fotodinâmica
<b>TGO</b>	Transaminase Glutâmica Oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase Glutâmica Pirúvica
<b>UnB</b>	Universidade de Brasília
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES .....	22
1.2 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES .....	23
1.2.1 Miltefosina .....	24
1.2.2 Pentoxifilina .....	25
1.2.3 Terapia fotodinâmica e os Carbon quantum dots (C-dots) .....	25
1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS .....	27
1.4 NOVAS PERSPECTIVAS PARA O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES .....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3 MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 DELINEAMENTO .....	32
3.2 PREPARO DOS REAGENTES PARA AVALIAÇÃO DAS TERAPIAS TESTADAS .....	35
3.2.1 Preparo do Meio de Cultura McNeal, Novy e Nicolle (NNN) Modificado .....	35
3.2.2 Preparo do Meio de Cultura Schneider .....	36
3.3 PREPARAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> PARA INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS .....	37
3.3.1 Desciopreservação dos Isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	37
3.3.2 Crescimento e Contagem dos Parasitos em Câmara .....	37
3.3.3 Infecção dos Camundongos .....	38
3.3.4 Confirmação da Infecção dos Camundongos .....	39
3.3.4.1 Aspirado em Meio NNN Modificado .....	39
3.3.4.2 Pesquisa de Amastigotas .....	40
3.4 PREPARAÇÃO DOS FÁRMACOS .....	41
3.4.1 Miltefosina .....	41
3.4.2 Pentoxifilina .....	41
3.4.3 C-dots .....	41
3.4.4 Hidrogel .....	42
3.5 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS .....	42

3.5.1 Esquema de Administração das Drogas por Via Orogástrica .....	42
3.5.2 Administração do Hidrogel carregado com C-dots.....	44
3.6 TERAPIA FOTODINÂMICA.....	45
3.6.1 Esquema Utilizado na TFD .....	45
3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS .....	47
3.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA.....	47
3.8.1 Critérios Parasitológicos.....	47
3.8.1.1 Diluição Seriada .....	47
3.8.1.2 Avaliação da viabilidade celular pela técnica do Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) .....	50
3.8.1.3 Análise Histopatológica .....	51
3.8.2 Medição do Diâmetro de Patas .....	51
3.8.3 Pesagem dos Camundongos .....	52
3.8.4 Critérios Moleculares.....	53
3.8.4.1 Extração e Quantificação do DNA dos Macerados das Patas .....	53
3.8.4.2 PCR em Tempo Real (qPCR) .....	53
3.8.5 Critérios Bioquímicos .....	54
3.8.6 Critérios Imunológicos.....	55
3.8.6.1 Obtenção dos Macrófagos Peritoneais .....	55
3.8.6.2 Expressão de Corpúsculos Lipídicos Detectada pela Coloração com Óleo Vermelho O ( <i>Oil Red O</i> ).....	56
3.8.6.3 Determinação da Produção de ON .....	57
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
3.10 QUESTÕES ÉTICAS.....	58
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
4.1 CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS.....	59
4.1.1 Aspirados em Meio NNN Modificado .....	59
4.1.2 Pesquisa de Amastigotas.....	59
4.1.3 qPCR Papel Filtro.....	60
4.2 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA.....	61
4.2.1 Critérios Parasitológicos.....	61
4.2.1.1 Aspirados em Meio NNN Modificado para Avaliação de Cura Parasitológica .....	61

4.2.1.2 Pesquisa de Amastigotas.....	62
4.2.1.3 Diluição Seriada e MTT.....	64
4.2.2 Medição do Diâmetro de Patas.....	68
4.2.3 Pesagem dos Camundongos.....	71
4.2.4 Critérios Moleculares.....	73
4.2.4.1 qPCR.....	73
4.2.5 Critérios Bioquímicos.....	78
4.2.6 Critérios Imunológicos.....	81
4.2.6.1 Expressão de Corpúsculos Lipídicos Detectada pela Coloração com <i>Oil Red O</i> .....	81
4.2.6.2 Determinação da Produção de Óxido Nítrico.....	89
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO B – APROVAÇÃO ADICIONAL PELO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO C – PREMIAÇÃO INTERNACIONAL RECEBIDA PELA AUTORA DO PROJETO.....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO E – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO.....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXO F – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO.....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO G – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO.....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO H – PEDIDO DE REGISTRO DE PATENTE.....</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO I – REGISTRO DE PATENTE.....</b>	<b>129</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e causam grande impacto na saúde pública, por representarem um complexo de doenças com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (1).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as seis doenças infecciosas mais importantes que acometem populações negligenciadas. A Leishmaniose Visceral (LV) apresenta-se de forma sistêmica e é altamente letal quando não tratada, e a Leishmaniose Tegumentar (LT) está associada à capacidade de produzir deformidades, estando mais associada às lesões desfigurantes e estigmatizantes (2).

No Brasil, no período de 2000 a 2013, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresentou média anual de 24.694 casos registrados e coeficiente médio de detecção de 13,5 casos por 100 mil habitantes. Neste período, observou-se uma tendência de redução da endemia, passando de um coeficiente de detecção de 20,3 casos por 100 mil habitantes no ano 2000 para 9,1 casos em 2013 (3). Outra análise da distribuição de casos de LC foi realizada durante o período 2001 a 2017, e constatou o registro de 379.571 casos no Brasil, com incidência média de 11,86 casos por 100 mil habitantes, corrobora com dados anteriores, demonstrando a redução do número de casos (4).

Entretanto, no ano de 2020, o Brasil esteve entre os sete países (Afeganistão, Argélia, Colômbia, Iraque, Paquistão e República Árabe Síria), que registrou 6.000 novos casos de Leishmaniose Cutânea (LC), representando mais de 80% dos casos globais (5).

De acordo com a Organização Pan Americana da Saúde, a pandemia de COVID-19 afetou diretamente as ações de vigilância e controle das leishmanioses, destacando o impacto da nas ações de busca ativa, detecção precoce e tratamento de casos, bem como em outras atividades de campo (6). Entretanto, em 2020, diante

da pandemia, foi possível constatar um aumento de consultas clínicas com diagnóstico de LT no Brasil, em comparação ao período pré-pandemia entre 2017 a 2019, ressaltando que ocorreu em todas as regiões do país e mais significativamente nas regiões Norte e Centro-Oeste (7).

## 1.2 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

A LTA pode se apresentar nas formas cutânea (LC), disseminada (LD), difusa (LCD) e mucosa (LM). O tratamento precoce melhora o prognóstico da LTA para a LC, apresentando níveis maiores de cura (8)(9). A busca por formas de tratamento com drogas de fácil administração, baixa toxicidade e com maior eficácia terapêutica é o objeto de estudos que visam à cura da LTA. Os medicamentos existentes, os padronizados pelos órgãos governamentais de saúde, não oferecem essa facilidade de uso e a eficiência desejada. A toxicidade oferecida pelas atuais medicações empregadas é a principal causa da necessidade de se buscar novas alternativas para se alcançar a cura. Estes fatos justificam as pesquisas sobre o uso de novas drogas, assim como estimulam o emprego de novos esquemas terapêuticos com drogas ou medicações já usadas contra a LTA (10).

O tratamento de LTA induz diferentes respostas nos pacientes, uma está relacionada com a espécie do parasita, a outra com a condição imunológica do indivíduo e com o estado de saúde geral do paciente tratado, por isso, é importante salientar que é necessário observar a forma clínica da doença para o correto uso da medicação (11).

O antimonial pentavalente (SbV) N-metil glucamina (NMG) é a droga de primeira linha no Brasil para tratamento de LTA e a principal opção terapêutica (12), porém, a avaliação cardíaca é necessária visto que se trata de uma droga com potencial cardiotoxico (13). Entretanto, há constatação de que as lesões tratadas com este medicamento podem aumentar de diâmetro nas primeiras semanas de exposição à droga, ocorrendo uma diminuição significativa das úlceras no fim do tratamento (14).

A falta de resposta adequada em alguns casos e os efeitos adversos geraram a necessidade de uso das drogas que foram padronizadas como a de segunda linha contra a LTA, como a anfotericina B lipossomal, a miltefosina e a pentamidina, também indicadas nos casos de resistência ou impossibilidade de uso do SbV. Estas

possuem a limitação de apresentarem alto custo, necessitarem de mais recursos técnicos nos serviços de saúde onde utilizados e também apresentarem efeitos adversos graves frequentes (3,15). Além disso, a possibilidade de usar apenas drogas orais no tratamento da LTA facilitaria a administração dos medicamentos e aumentaria a adesão ao tratamento (16).

Além das drogas de primeira e segunda linha, trabalha-se testando drogas que já foram aprovadas para outros fins para tratar a leishmaniose. Esta prática conhecida como reposicionamento de fármacos é utilizada para experimentar medicamentos já existentes no tratamento de uma ou mais doenças para o qual a droga foi desenvolvida, uma opção que pode apresentar resultados promissores (15,17).

### 1.2.1 Miltefosina

A Miltefosina (M) é uma droga que age contra a *Leishmania* e células tumorais, induzindo a apoptose e alterando as vias de sinalização celular mediadas por lipídeos. A droga pode causar efeitos adversos, como vômitos e diarreias, aumentar os níveis sanguíneos de transaminases, bem como elevar a uremia e creatininemia (18). Estudos indicam boa atividade leishmanicida nos testes *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Formas promastigotas da espécie *L. (L.) amazonensis* foram as mais sensíveis. Estudos apontam que a miltefosina teve eficácia superior ao N-metil glucamina tanto nos estudos *in vitro*, quanto na pesquisa *in vivo* (19). A miltefosina também foi eficaz experimentalmente *in vivo*, utilizando camundongos BALB/c, contra um isolado de *L. (L.) amazonensis* de um paciente brasileiro com LCD (20). Esta eficácia foi comprovada após o acompanhamento clínico dos animais por 15 semanas após o tratamento, que não mostrou sinais de recidiva da doença (21). Pode ser considerada a primeira droga oral com sucesso no tratamento de LTA (22,23).

Um recente estudo que avaliou a associação da miltefosina oral e antimoniais pentavalentes associados à pentoxifilina (P) para o tratamento de 43 pacientes com LTA, mostrou que a combinação oral de M+P tem uma taxa de cura equivalente à da SbV+P intravenosa tradicional nesta população, satisfatoriamente apresentando menos efeitos adversos. Entretanto, sugere-se que mais estudos com número maior



de pacientes e maior tempo de acompanhamento sejam realizados para avaliar este tipo de tratamento oral (24).

### 1.2.2 Pentoxifilina

A Pentoxifilina é uma droga de ação vasodilatadora utilizada no tratamento de insuficiência vascular periférica, doenças cerebrovasculares, e tem sido utilizada experimentalmente no tratamento de algumas doenças inflamatórias por ter uma ação inibitória sobre o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), atenuando a resposta imune e diminuindo a inflamação tecidual (25–27).

Evidências científicas sobre o uso da pentoxifilina no tratamento da LM, que incluíram pacientes infectados por *L. braziliensis*, mostraram que a terapia com pentoxifilina associada ao SbV levou a uma taxa de cura maior e mais rápida das lesões do que a terapia com o antimonial isolado (28). Quando a associação de pentoxifilina com SbV foi utilizada para tratar pacientes com LC, não foi observada uma maior taxa de cura, entretanto, os níveis de TNF e IFN- $\gamma$  diminuíram significativamente quando comparado ao tratamento com SbV e placebo (29).

Ao avaliar experimentalmente a eficácia da miltefosina associada à pentoxifilina comparada apenas à miltefosina, no tratamento da LC em camundongos C57Bl/6, constatou-se via teste colorimétrico que a associação M+P é mais eficaz que a administração da miltefosina isoladamente (18).

### 1.2.3 Terapia fotodinâmica e os *Carbon quantum dots* (C-dots)

Estudos utilizando a Terapia Fotodinâmica (TFD) com *laser* (luz vermelha com comprimento de onda de 670nm) em camundongos C57Bl/6 infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram resultados significativos quanto à eficácia da terapia associada com ftalocianina de cloro-alumínio lipossomal e miltefosina. No entanto, os resultados foram limitados, visto que a toxicidade *in vivo* não foi avaliada e o mecanismo de ação dessa modalidade terapêutica também precisa ser melhor investigada (30). Atualmente, a TFD vem sendo aplicada, utilizando agentes

fotossensibilizantes associados à luz azul (comprimento de onda de 417nm), no tratamento contra células cancerígenas, queratoses actínicas e fotoenvelhecimento, visto que esse tipo de luz tem excelente depuração das lesões alvo e não afeta o número de células de *Langerhans* ou danifica oxidativamente o DNA da pele tratada, o que geralmente ocorre na TFD com a luz vermelha (31).

Os *Carbon quantum dots* (C-dots), que são nanotubos de carbono com propriedades fotoluminescentes, despertam interesse crescente por possuírem benefícios distintos, como inércia química, baixo fotobranqueamento, baixa citotoxicidade, baixo custo, fácil preparação e excelente biocompatibilidade, podendo ser considerados excelentes nanodots semicondutores (32). Além disso, os C-dots exibem fluorescência dependendo do comprimento de onda de excitação, isso quando revestidos em papel, fibras vegetais, pelos de animais, penas e pele, e podem inclusive serem usados para distinguir produtos biológicos de produtos sintéticos (33). A emissão é dependente de excitação, e o comprimento de onda do pico pode ser ajustado em toda a janela visível, de 400 a 750nm (34), e quando se trata de meios biológicos, é essencial que as radiações utilizadas não sejam detentoras de altas energias, visto que são nocivas aos tecidos (35). Complementarmente, um estudo demonstrou que os C-dots apresentam fotoluminescência UC, ou seja, quando excitados por radiações da região do infravermelho, emitem luz em comprimento de onda menor que o infravermelho, conferindo-lhes potencial para uso no desenvolvimento de novos compósitos fotocatalizadores e células solares, e principalmente para aplicações em meio biológico (36).

Estudos de toxicidade realizados em plantas demonstraram que os C-dots foram permeáveis às células e não impediram o seu crescimento. Em camundongos, que receberam C-dots em solução aquosa durante cinco semanas, todos sobreviveram e nenhum exibiu qualquer sintoma de anorexia ou outros sintomas clínicos, como perda de pelo, escaras, vômitos ou diarreia, nem apresentaram qualquer comportamento violento ou letárgico, características semelhantes observadas no grupo controle que recebeu água normal (33). Outros estudos de toxicidade foram conduzidos por outros grupos de pesquisa, e todos os resultados sugerem que os C-dots têm pouca ou nenhuma toxicidade (37,38), e poderiam possivelmente ser usados como um novo tipo de tinta fluorescente biocompatível (33).

Ademais, os C-dots vêm sendo usados, com sucesso, no carreamento de fármacos (39), inclusive no tratamento contra câncer (40), e neste caso, sugere-se o

potencial dessas nanopartículas como agente de terapia imunológica para o tratamento de câncer de pele (41).

Além disso, há registro do uso de pomadas antiparasitárias baseadas em um nanocompósito de C-dots e de C-dots associados com gallium (Ga) em camundongos infectados com *Leishmania sp.* e que apresentaram atividade leishmanicida e não tóxica (42). Contudo, a avaliação da eficácia e toxicidade dos C-dots, neste estudo com a proposta de serem ativados pela luz azul, possibilitaria a utilização dessas formulações para o tratamento de LC.

### 1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

Sabe-se que algumas citocinas pró ou anti-inflamatórias estão associadas às respostas do hospedeiro quando acometido pela leishmaniose, e estão relacionadas respectivamente, no controle ou exacerbação da infecção. Entretanto, é relevante o estudo de outros mediadores inflamatórios e marcadores de estresse, visto a necessidade de outros biomarcadores para leishmaniose (43).

O óxido nítrico é uma espécie reativa de nitrogênio produzido por macrófagos, células endoteliais e outras células do sistema imunitário por meio da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e é importante para os mecanismos de defesa de qualquer organismo, pois trata-se de uma molécula mensageira inter e intracelular com importantes funções biológicas, inclusive antimicrobiana e antiparasitária (44–47).

Além disso, o óxido nítrico atua na manutenção da homeostase, inibindo a ativação das células endoteliais, modulando a expressão de moléculas de adesão e a função plaquetária. Essas moléculas podem regular funções do sistema imunitário, incluindo a inibição da proliferação celular de células T e B, a adesão e rolamento de leucócitos no endotélio microvascular e a produção de citocinas (44–48).

A produção de superóxido e óxido nítrico (NO) individualmente tem sido associada ao desenvolvimento de várias doenças, e as interações entre eles podem ser importantes na patologia da doença, visto que o equilíbrio entre os dois é um determinante crítico na etiologia de muitas doenças humanas, incluindo aterosclerose, doença neurodegenerativa, isquemia-reperfusão e câncer, e na leishmaniose (49–52).

Outro fator importante, é que a produção sustentada de NO confere aos macrófagos atividade citostática ou citotóxica contra vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos, e células tumorais (53).

Estudos demonstram que o óxido nítrico tem sido implicado diretamente na atividade leishmanicida dos macrófagos, importantíssimo para conter amastigotas intracelulares estabelecidas, e conseqüentemente, na resolução da doença (51,54). Adicionalmente, seus oxidantes derivados podem desempenhar papéis importantes no combate ou no agravamento dos processos da doença (49).

Há relatos de que moléculas inflamatórias foram expressas em lesões cutâneas de camundongos C57BL/6 e BALB/c durante diferentes fases de infecção na LC, sugerindo que podem ser fatores preditivos para controle de leishmaniose murina (43).

Experimentalmente, camundongos BALB/c (suscetíveis) e uma linhagem A/J (resistentes) foram infectados subcutaneamente na pata traseira com promastigotas de *Leishmania amazonensis* e formaram-se lesões em diferentes localidades para cada linhagem. Em BALB/c, foram encontradas na medula óssea, tendão, anexos cutâneos e linfonodos regionais. Em camundongos A/J as lesões foram bem localizadas, apresentando fibrose, infiltração linfocítica e macrofágica. Neste caso, a microscopia demonstrou que não havia destruição notável de leishmânias dentro de macrófagos de qualquer linhagem de camundongo. No entanto, nos camundongos A/J, os macrófagos parasitados eram frequentemente necróticos, e as leishmânias eram vistas livres no tecido intersticial, o que pode auxiliar na interpretação da patogênese da LC (50).

Em pesquisa que monitorou a formação de óxido nítrico durante o curso da infecção por *L. amazonensis* em tecidos de camundongos BALB/c e camundongos C57BL/6 (relativamente resistentes), foi possível constatar a formação de NO e agentes nitrantes derivados dentro de macrófagos localizados nas lesões do coxim plantar das duas linhagens, com produção máxima acontecendo em diferentes estágios da infecção. Ao avaliar o aumento tardio da síntese de NO, detectado nos camundongos BALB/c, verificou-se que esse fato não elimina os parasitos e parece contribuir para o estabelecimento de infecções secundárias (52). Os achados anteriores corroboram com resultados obtidos em outros estudos, os quais demonstram que a produção local de NO em macrófagos é um mecanismo de defesa importante para a eliminação de patógenos intracelulares (53,55,56).

Recentemente, o uso de nanopartículas de quitosana liberadoras de óxido nítrico (NONPs) foi investigado experimentalmente em relação ao uso no tratamento de LC, indicando seu potencial *in vitro* contra *Leishmania amazonensis* (57). A produção de óxido nítrico também foi avaliada em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* por meio de quantificação em citometria de fluxo, demonstrando que há uma diferença significativa na produção desta molécula entre as duas espécies de *Leishmanias* (58). A indução de óxido nítrico em macrófagos peritoneais por um derivado de triazol, que possui atividade antileishmania, melhora sua eficácia na infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis* (59).

Em relação às organelas corpúsculos lipídicos, sabe-se que são ricas em lipídios e estão presentes nas células de quase todos os organismos, abrangendo animais, plantas e leveduras. São moléculas sinalizadoras de vias intracelulares, possuem a capacidade de desencadear respostas fisiológicas importantes, e estão aumentadas em macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células endoteliais presentes nos processos inflamatórios (47,60,61).

Quanto às infecções relacionadas à leishmaniose, experimentalmente foi observado acúmulo de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais na infecção murina por *Leishmania amazonensis* (47,62), e por *Leishmania infantum* (63).

A formação de gotículas lipídicas, sua localização e dinâmica durante a infecção por macrófagos por *Leishmania major* foi avaliada experimentalmente, e foi possível constatar a habilidade de *L. major* para desencadear o acúmulo dessas gotículas em macrófagos. Além da produção de corpúsculos lipídicos, os macrófagos podem aproveitar essas fontes de alta energia na defesa contra a infecção parasitária (64).

Diante o exposto, sugere-se a relevante avaliação da influência imunomoduladora das drogas miltefosina, pentoxifilina, TFD, e associações, utilizadas no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis*, sobre mecanismos do sistema imunitário inato, por meio da capacidade fagocitária, produção de óxido nítrico e expressão de corpúsculos pelos monócitos de camundongos saudáveis.

#### 1.4 NOVAS PERSPECTIVAS PARA O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Os avanços obtidos no tratamento das leishmanioses, sobretudo no que tange aos objetivos do presente trabalho, impulsiona a necessidade de se investigar o reposicionamento de fármacos existentes, para que possam ser empregados no Brasil a fim de tornar mais fácil através da ingestão oral e tratamento tópico propiciando o aumento à adesão ao tratamento de pacientes portadores de LTA.

Trabalhos experimentais *in vivo* utilizaram as drogas pentoxifilina e miltefosina no tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis*, por esse motivo, neste estudo optou-se pela infecção de outra linhagem de camundongos BALB/c, e outra cepa do parasito, a *L. (V.) braziliensis*, pois estas ainda não haviam sido avaliadas experimentalmente com o tipo de medicação proposta (18,30). Além disso, a *L. (V.) braziliensis* predomina no cenário epidemiológico do Centro-Oeste do país (65), é a espécie que mais acomete pessoas infectadas que buscam tratamento no Distrito Federal (DF) e a mais largamente distribuída no Brasil e nas Américas (66).

Adicionalmente, com a intenção de ampliar as opções de tratamento da LC causada por *L. (V.) braziliensis*, foi utilizado neste estudo um hidrogel formulado a partir da biomassa natural de *Magonia pubescens*, um fruto do cerrado brasileiro, popularmente conhecido como Tingui, já conhecido pela medicina popular para tratar úlceras originadas por picadas de insetos. A grande vantagem deste hidrogel na aplicação médica, é pelo fato de ser biocompatível e atóxico, podendo ser aplicado como uso tópico ou uso interno, além de ser biodegradável e de baixo custo (67,68).

Os extratos de *M. pubescens* foram testados em diferentes concentrações em culturas de formas promastigotas de *L. amazonensis*, demonstrando capacidade leishmanicida com ação inibitória do crescimento de promastigotas (69).

O extrato de *M. pubescens* possui capacidade antiparasitária, apresentando toxicidade para o controle de *Rhipicephalus sanguineus* devido ao seu potencial larvicida (70), fator relevante visto que foram isoladas promastigotas de *Leishmania infantum* viáveis nesta espécie de carrapato (71).

Diante das possibilidades de uso e pela ação promissora da *M. pubescens*, o hidrogel foi carregado com C-dots e utilizado de forma tópica no tratamento experimental de LC em camundongos BALB/c, a fim de analisar possível eficácia no tratamento da doença.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia, efeitos adversos e ação imunomoduladora da associação da miltefosina com a pentoxifilina orais e da TFD com hidrogel carregado com C-dots no tratamento da LC em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Testar e comparar a eficácia terapêutica da associação da miltefosina com a pentoxifilina e a TFD com hidrogel carregado com C-dots no tratamento da LC em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* com camundongos saudios e camundongos infectados e não tratados;

2.2.2 Testar a eficácia da TFD com hidrogel carregado com C-dots associado à pentoxifilina no tratamento de camundongos BALB/c infectados *L. (V.) braziliensis*.

2.2.3 Testar a eficácia da miltefosina, da pentoxifilina e da TFD, usados isoladamente, no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis*.

2.2.4 Verificar efeitos adversos dos esquemas terapêuticos acima descritos em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* por meio de análises bioquímicas e histopatológicas.

2.2.5 Quantificar o número de parasitos por pata de camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR), a fim de avaliar a diminuição do número de leishmânias nos grupos após o tratamento.

2.2.6 Avaliar a influência imunomoduladora das drogas miltefosina, pentoxifilina e TFD sobre mecanismos do sistema imunitário inato, por meio da capacidade fagocitária, produção de óxido nítrico, e expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos de camundongos saudáveis.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo experimental *in vivo*, que foi desenvolvido no Laboratório de Dermatocologia da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade de Brasília (UnB). Neste estudo foram utilizados 54 camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus*, linhagem BALB/c, com aproximadamente 27g, idade 120 dias, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O transporte dos animais de São Paulo para Brasília foi realizado por via aérea, em caixas apropriadas, e não houve dano à saúde de nenhum camundongo. Os animais recebidos estavam livres de agentes patogênicos, informação garantida por um atestado sanitário emitido por veterinário responsável.

Estes animais foram escolhidos por apresentar suscetibilidade à infecção por diferentes espécies de *Leishmania* sp. (72,73), e ainda, por desenvolver lesões cutâneas semelhantes ao ser humano, e melhor que em camundongos C57BL/6, bem como disseminação parasitária para órgãos como fígado, baço e linfonodos (72–74). Além disso, trata-se de uma linhagem híbrida, que possui uniformidade genética, o que permite uma resposta semelhante entre os animais em estudo (75).

Os animais foram alocados aleatoriamente em novas caixas e mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina (FM) da UnB, em ambiente controlado adequadamente por luminosidade, com ciclos de 12 horas no claro e 12 horas no escuro, para simular dia e noite, e com água e ração *ad libitum* durante o período de quarentena (20 dias) e por todo o período que permaneceram alojados durante o estudo. Essa aclimação permitiu que os animais se adaptassem ao ambiente de laboratório, à alimentação empregada, ao manuseio utilizado e ao controle de prováveis doenças (75). Após o período de quarentena, essencial para que os animais se adaptassem ao ambiente, passando pelo período de aclimação para depois serem utilizados, foi realizada nova randomização para composição dos grupos. Duas vezes por semana as gaiolas foram lavadas, e as maravalhas utilizadas para forrá-las foram trocadas por novas esterilizadas.

Os camundongos foram divididos em 9 grupos devidamente identificados com as letras de A a I, cada um composto por 6 animais. Apenas um grupo não foi infectado



e também não recebeu tratamento com droga, identificado como grupo A, e que serviu como controle negativo (CN). O grupo B foi o único infectado que não recebeu tratamento com droga, servindo como controle positivo (CP). Estes grupos controles foram submetidos à ingestão de solução fisiológica nas mesmas condições dos animais que receberam o tratamento com as drogas em estudo, isso para garantir que aqueles animais pudessem ser comparados igualmente em relação à metodologia aplicada daqueles que seriam tratados com medicamentos. Os outros 7 grupos infectados receberam tratamento com drogas, sendo o grupo C tratado com miltefosina (M), o grupo D tratado com pentoxifilina (P), o grupo E tratado com terapia fotodinâmica (TFD), o grupo F tratado com associação do miltefosina e pentoxifilina (MP), o grupo G tratado com associação da pentoxifilina e TFD (PTFD), o grupo H tratado com miltefosina e TFD (MTFD), e o grupo I tratado com associação do miltefosina, pentoxifilina e TFD (MPTFD).

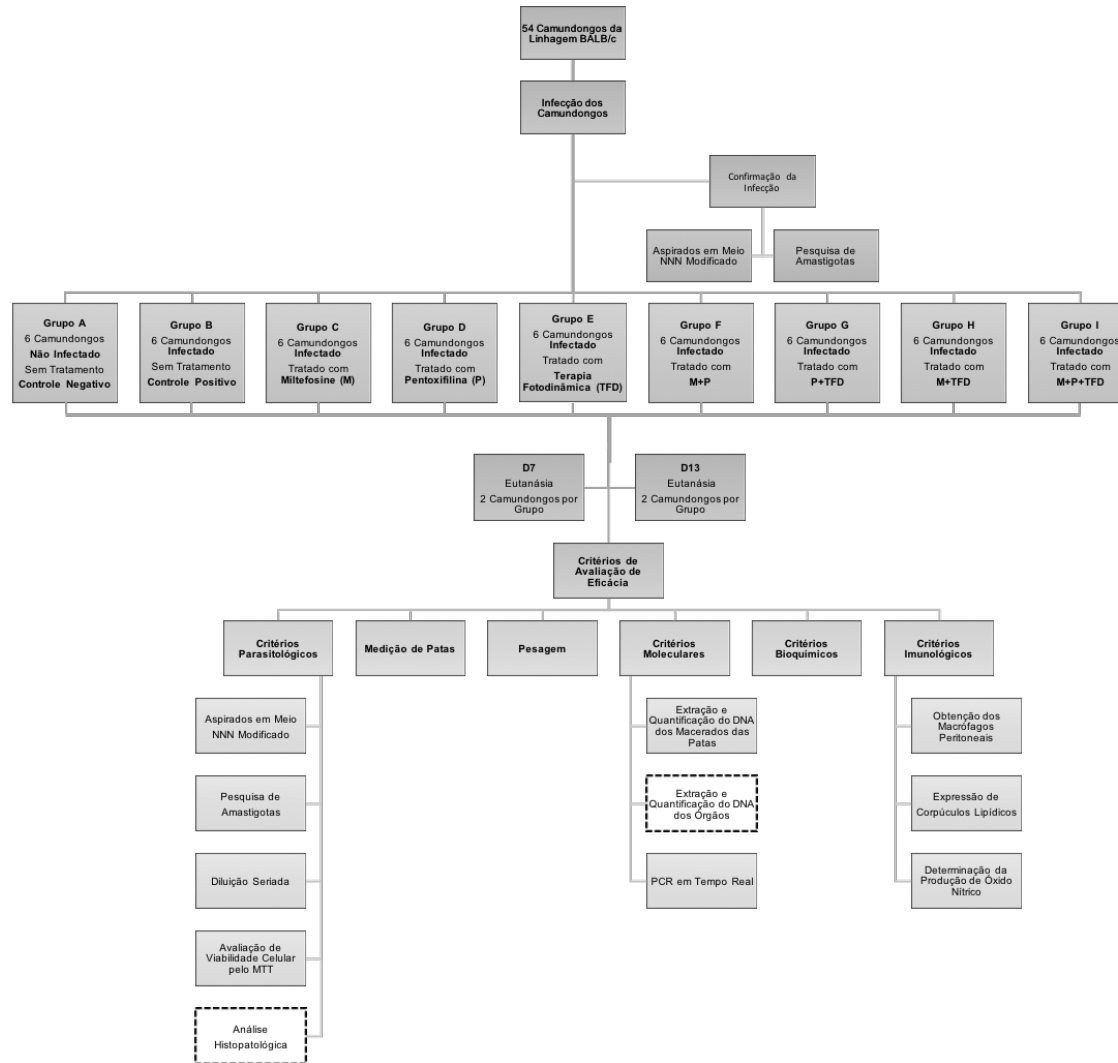


Figura 1 - Fluxograma do estudo.

Os animais também foram identificados individualmente dentro do seu grupo por uma marcação na cauda, assim, os dados coletados posteriormente poderiam ser melhor comparados entre os animais de cada grupo. Os camundongos foram marcados com um, dois, três ou quatro traços na cauda para identificação dentro dos seus grupos: I, II, III e IV (Figura 2). Os animais identificados como V e VI, foram marcados na cauda com o próprio numeral em romano.

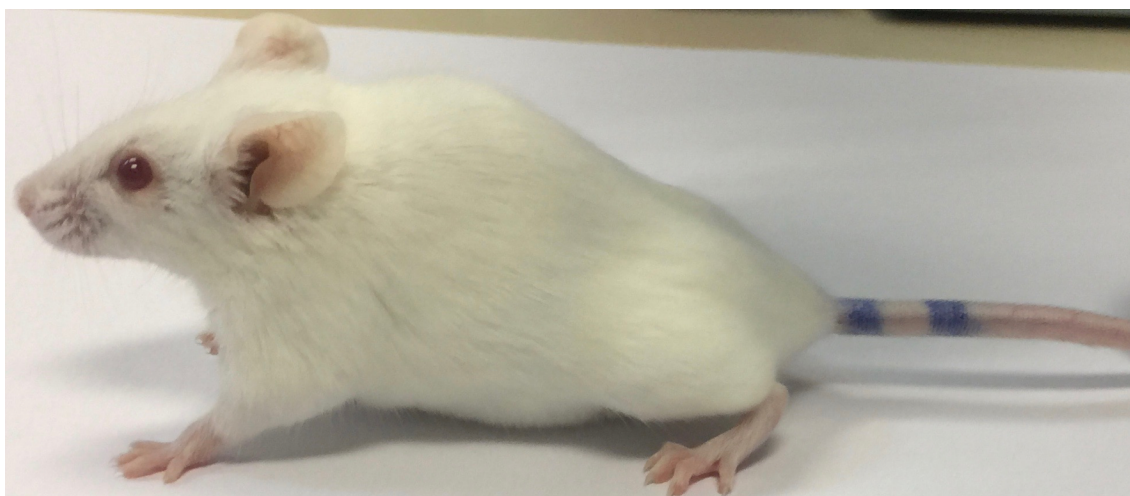


Figura 2 - Camundongo BALB/c marcado com dois traços na cauda para identificação no grupo.

Fonte: Acervo Pessoal.

## 3.2 PREPARO DOS REAGENTES PARA AVALIAÇÃO DAS TERAPIAS TESTADAS

### 3.2.1 Preparo do Meio de Cultura *McNeal, Novy e Nicolle* (NNN) Modificado

Os meios de cultura NNN utilizados neste estudo foram preparados baseados na metodologia descrita por Romero e colaboradores em 1999 (76), porém, adaptada de acordo com testes realizados no Laboratório de Dermatômica (Tabela 1). O ágar utilizado foi o *Brain Heart infusion Agar* (BHI, *Special Infusion Agar* - Himedia REF M211-500G), dissolvido em água destilada em temperatura de aproximadamente 360°C (em agitador magnético) e em seguida, autoclavado a 121°C por 30 minutos. O sangue de coelho foi coletado a partir de punção cardíaca, com o animal devidamente anestesiado, e transferido para um balão volumétrico com pérolas de vidro para sua desfibrinação. O ágar preparado foi resfriado até atingir a temperatura

de 50°C, controlado com o auxílio de um Banho Maria, visto que em temperaturas superiores, ao ser misturado ao sangue de coelho o meio geralmente muda suas características físico-químicas, apresentando um aspecto semelhante ao chocolate, que é inadequado para o uso com leishmânias. Em seguida, a solução injetável de sulfato de gentamicina foi adicionada ao meio. Em uma capela de fluxo laminar os reagentes foram homogeneizados, e o meio pronto foi alíquotado (2mL) em tubos de ensaio de vidro sem anticoagulante. Os tubos contendo o meio de cultura permaneceram em temperatura ambiente por 24h para verificação do teste de esterilidade, posteriormente foram armazenados sob refrigeração (8°C - 10°C) até o uso.

Tabela 1 - Reagentes e sistemas utilizados para o preparo do meio NNN modificado.

Reagentes	Volume (mL)	Equivalência
BHI	100mL	4%
Sangue de Coelho	22mL	22%
Sulfato de gentamicina	0,76mL	250µg

### 3.2.2 Preparo do Meio de Cultura *Schneider*

O meio *Schneider* (Sigma Aldrich, código S0146) utilizado neste estudo foi complementado com 20% de *Fetal Bovine Serum* (SFB) (INVITROGEN, código 12657-029) inativado em banho Maria a 56°C por 2h. Em uma capela de fluxo laminar, o *Schneider* e o SFB foram aspirados com uma pipeta sorológica de vidro graduada (20mL 1/10) e transferidos para um frasco de cultivo celular (KASVI, 50mL, tampa ventilada, com filtro, código K11-2050), bem como os 250µg de sulfato de gentamicina. O meio preparado foi armazenado sob refrigeração (8°C-10°C) até o uso.

Tabela 2 - Reagentes e sistemas utilizados para o preparo do meio Schneider.

Reagentes	Volume (mL)	Equivalência
Schneider	100mL	80%
SFB	20mL	20%
Sulfato de gentamicina	0,76mL	250µg

### 3.3 PREPARAÇÃO DOS ISOLADOS DE *L. (V.) braziliensis* PARA INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS

#### 3.3.1 Descrípreservação dos Isolados de *L. (V.) braziliensis*

A amostra de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP13396=IOC-L2483) utilizada neste estudo foi fornecida pelo Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da UnB. O isolado que era mantido criopreservado em nitrogênio líquido (-196°C) foi descongelado em temperatura ambiente, e com o auxílio de uma seringa de 1mL, alíquotas de 0,2mL foram transferidas para tubos contendo meio de cultura NNN modificado, e posteriormente armazenadas em estufa incubadora em temperatura de 24°C a 26°C para crescimento dos parasitos.

#### 3.3.2 Crescimento e Contagem dos Parasitos em Câmara

Os tubos de NNN modificado contendo os isolados de *L. (V.) braziliensis* foram observados diariamente para acompanhamento do crescimento dos parasitos. Após esse período foi possível constatar um crescimento significativo, a partir de aproximadamente 4 a 5 dias, indicando a fase logarítmica.

Para realizar a contagem em câmara de Neubauer, uma alíquota de 10µL da cultura foi ressuspensa em 90µL de solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS), e após homogeneização, parte dessa mistura foi utilizada para preencher a parte da câmara, a mesma utilizada para contagem de leucócitos. Quatro quadrantes (áreas marcadas em vermelho na (Figura 3) foram utilizados para contagem dos parasitos e o número total foi dividido por 4 para obtenção da média. As formas em início de divisão celular foram contadas como uma, e as formas em divisão avançada, contadas

como duas. Todas as formas que estavam próximas ou em cima da linha do quadrante, também foram contadas. Apenas os emaranhados celulares ou rosetas, não foram contabilizados. A obtenção da média das formas promastigotas foi calculada após 3 contagens, assim, foi possível determinar a quantidade de parasitos ( $10^7$ ) em volume de meio de cultura.

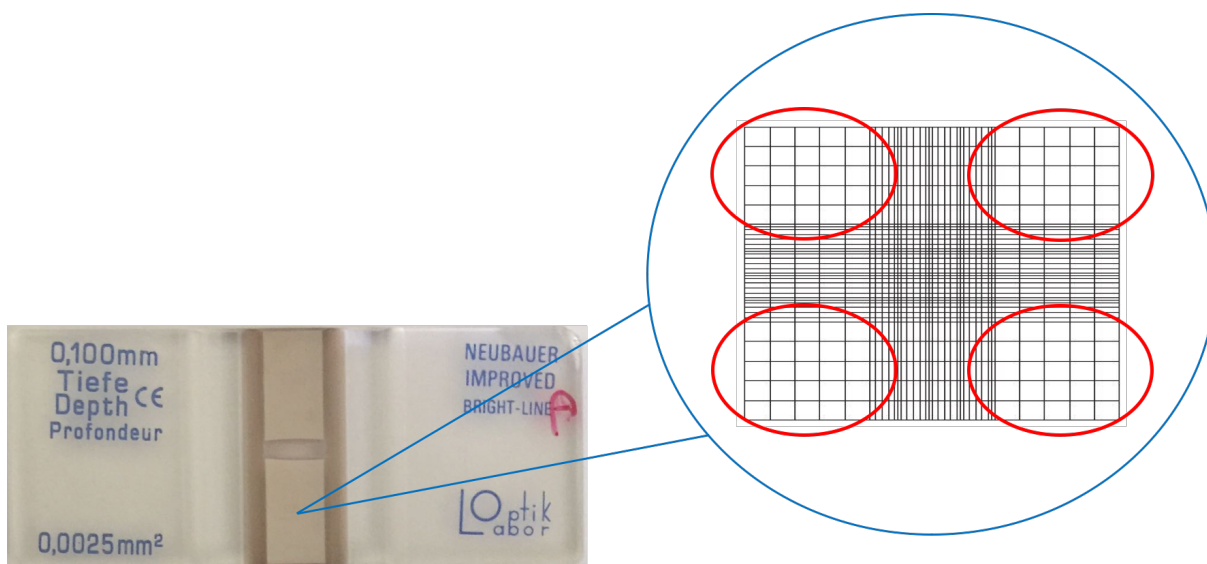


Figura 3 - Imagem da câmara de Neubauer com esquema de ampliação dos quadrantes utilizados para contagem dos parasitos.

Fonte: Acervo Pessoal.

### 3.3.3 Infecção dos Camundongos

Os animais dos nove grupos foram anestesiados com Quetamina e Xilasina e, apenas os camundongos de oito grupos foram submetidos à inoculação de um concentrado parasitário contendo  $3 \times 10^7$  formas de *L. (V.) braziliensis* em fase metacíclica de desenvolvimento. No grupo A os animais foram inoculados com solução fisiológica a 0,9%. A infecção dos animais foi feita na pata traseira direita por via subcutânea, com auxílio de uma seringa de insulina contendo 0,1mL do isolado de *L. (V.) braziliensis*, o mesmo volume foi utilizado para inoculação da solução fisiológica no grupo controle negativo. Após inoculados, os animais permaneceram no alojamento de animais por 45 dias até que o tratamento fosse iniciado.

### 3.3.4 Confirmação da Infecção dos Camundongos

#### 3.3.4.1 Aspirado em Meio NNN Modificado

A confirmação da infecção foi realizada aos 45 dias após inoculação dos animais por meio do aspirado da linfa da pata (Figura 4). Os animais foram anestesiados conforme citado na etapa de infecção, as patas foram higienizadas com álcool a 70%, e o aspirado realizado com uma seringa de insulina contendo uma solução preparada com 0,2mL de solução fisiológica a 0,9% e 250µg de sulfato de gentamicina. O material obtido da punção da pata foi transferido para tubos contendo o meio NNN modificado, previamente higienizados com álcool a 70%, e armazenados em estufa incubadora em temperatura entre 24°C e 26°C. Todos os tubos foram observados em microscópio de luz invertida (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) para a confirmação da infecção por meio do crescimento dos parasitos e conseqüentemente, para que o tratamento pudesse ser iniciado.



Figura 4 - Realização de aspirado na pata traseira direita de um camundongo BALB-c para confirmação da infecção por *L. (V.) braziliensis*.

Fonte: Acervo pessoal.

### 3.3.4.2 Pesquisa de Amastigotas

Após a realização do aspirado, especificamente no momento da retirada da agulha da pata do animal, ocorre um pequeno extravasamento da linfa, geralmente acompanhada de células sanguíneas, que é usada para confeccionar os esfregaços para a pesquisa de amastigotas. As lâminas contendo os esfregaços permaneceram em temperatura ambiente até a secagem do material, em seguida, foram fixadas com álcool metílico P.A. (CH<sub>4</sub>O) e coradas com corante *Giemsa* na proporção de 4:10 (Figura 5). A leitura das lâminas foi realizada pela responsável pelo projeto de maneira cega, em microscópio óptico com objetiva de 100 (aumento 1.000x) e óleo de imersão. Cada lâmina foi observada no microscópio por 20 minutos, tempo padronizado para garantir que todas fossem analisadas igualmente. A avaliação da infecção por meio da leitura dos esfregaços foi realizada no primeiro dia subsequente a seis dias de tratamento, no dia 7 (D7); e também no primeiro dia subsequente a 12 dias de tratamento, no dia 13 (D13).

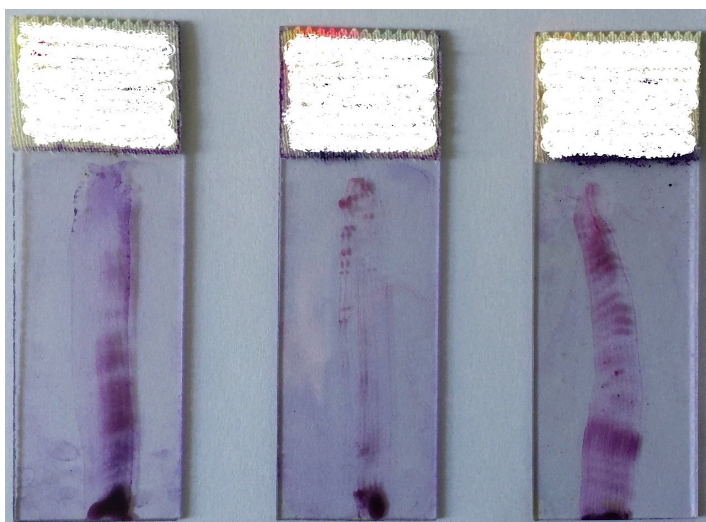


Figura 5 - Lâminas contendo os esfregaços para pesquisa de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* coradas com *Giemsa*.

Fonte: Acervo pessoal.



## 3.4 PREPARAÇÃO DOS FÁRMACOS

### 3.4.1 Miltefosina

Neste estudo foram utilizadas cápsulas de IMPAVIDO® que contém o ingrediente ativo miltefosina, um pó branco que foi diluído em água ultrapura, seguindo a dosagem de 200mg/Kg/dia, conforme utilizado em trabalhos experimentais *in vivo* (18,30). A droga foi preparada diariamente e sempre próximo ao horário da administração nos animais.

### 3.4.2 Pentoxifilina

Os comprimidos de pentoxifilina foram macerados e diluídos em água ultrapura, seguindo a dosagem de 8mg/Kg/dia, conforme descrito por Santarem e colaboradores em 2014 (18).

### 3.4.3 C-dots

A formulação de C-dots testada neste estudo foi preparada no Laboratório de Inorgânica e Materiais (LIMA) do Instituto de Química da UnB pelos colaboradores do projeto.

Para o preparo dos C-dots, 10g de guanidina sofreram condensação através do aquecimento até atingirem a temperatura de 550°C, por um período de 3h. O material formado foi então oxidado por meio de um refluxo com solução de ácido nítrico a 5M. A suspensão resultante foi filtrada através de membrana de 0,22µm e aquecida a 60°C até a completa evaporação do solvente. O material resultante foi combinado ao hidrogel (descrito no próximo tópico) para ser utilizado como droga tópica associada à TFD no tratamento dos animais em estudo.

### 3.4.4 Hidrogel

O hidrogel utilizado neste trabalho foi formulado pelo Laboratório de Materiais e Combustíveis (LMC) do Instituto de Química da UnB e foi registrado com pedido de patente sob o número BR102016004927-0.

Para esta aplicação, o hidrogel recebeu modificações em sua forma de purificação, passando por um processo de otimização a partir da modificação da metodologia de extração e purificação sugerida no pedido de patente, o qual, de forma geral, compreende as etapas de tratamento químico oxidativo para purificação e modificação química do hidrogel através de reticulação com N'N'-Metileno-bis-acrilamida (MBAam). Em seguida, o produto obtido apresentou-se de forma seca, podendo ser utilizado à temperatura ambiente, sob temperatura controlada em estufa em 50 a 60°C, à baixas temperaturas e pressão, sendo produzido de modo muito vantajoso por meio de liofilização por um período de 24 horas ou até a eliminação completa de água.

O Hidrogel foi purificado e carregado com C-dots apresentando-se em forma de pomada para uso tópico e disponível para aplicação nas patas dos animais infectados a serem tratados.

## 3.5 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS

### 3.5.1 Esquema de Administração das Drogas por Via Orogástrica

Os grupos tratados com as drogas miltefosina e pentoxifilina, bem como os que receberam as associações destas, e também os grupos controles que receberam solução fisiológica, foram administrados por via orogástrica, que permite que a substância seja introduzida pela boca e depositada diretamente no estômago. Esse procedimento foi realizado com uma seringa composta por uma agulha de gavagem específica para alimentação de camundongos, fabricada em aço inox BD-12, com cânula de 1,0mm de diâmetro e esfera de 1,7mm, raio de 40mm e comprimento de 31mm (Figura 6).

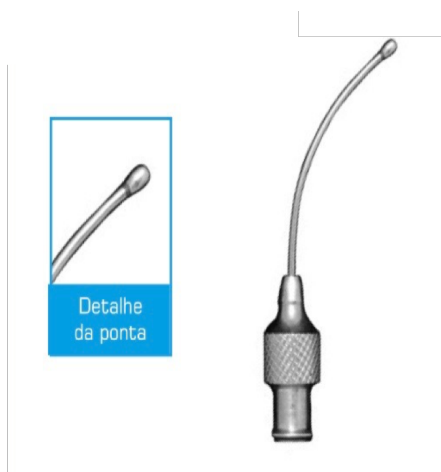


Figura 6 - Agulha de gavagem para alimentação de camundongos.

Fonte: <https://www.bonther.com.br/produtos/2/agulha-de-gavage-camundongo>.

A cânula rígida de aço inoxidável com a extremidade em esfera, esta que serve como protetor para evitar ferimentos no animal, foi lubrificada em um gel (sem cor e sem sabor) para facilitar a introdução na boca do animal, que foi realizada cuidadosamente passando pelo esôfago e chegando ao estômago onde o fármaco foi dispensado (Figura 7). A metodologia da administração de drogas por via orogástrica foi adotada neste estudo porque permite a aplicação exata da dose.

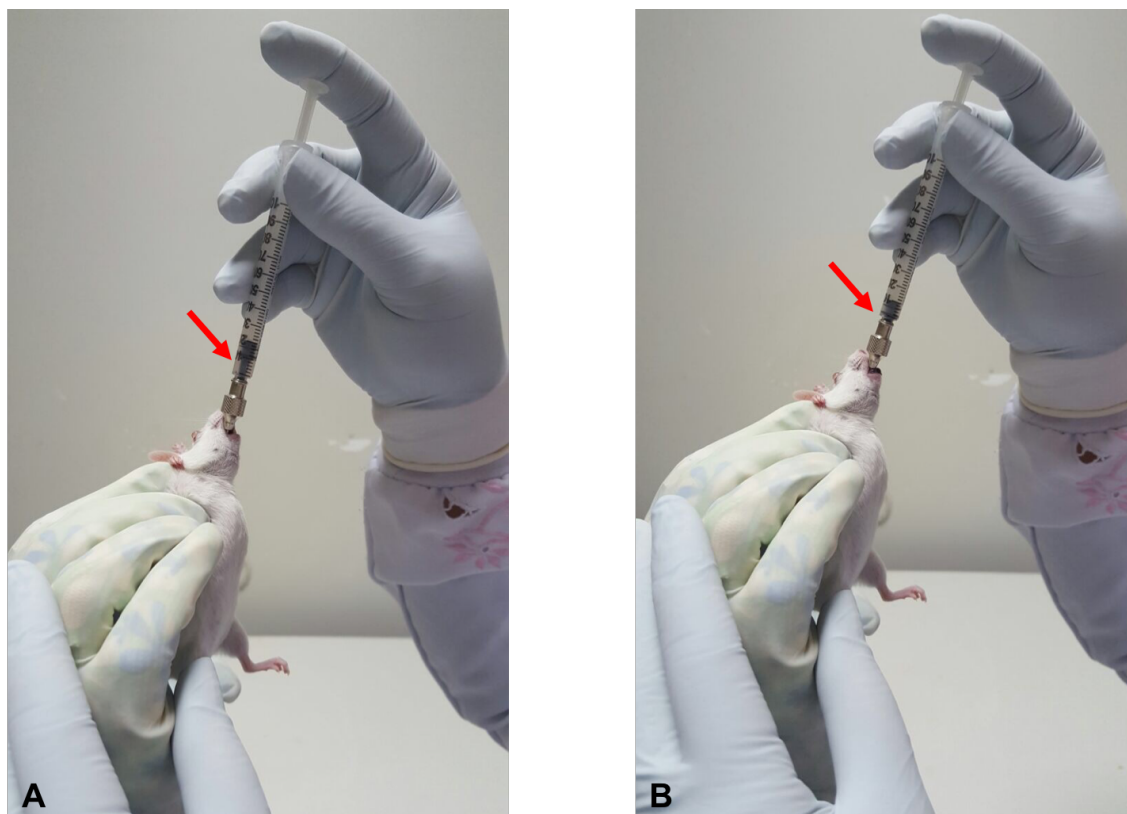


Figura 7 - Administração de fármacos em camundongos por via orogástrica. A. a seta em vermelho destaca a droga dentro da seringa antes da sua aplicação. B. a seta em vermelho demonstra que a droga foi inserida na cavidade bucal do camundongo.

Fonte: Acervo pessoal

### 3.5.2 Administração do Hidrogel carregado com C-dots

Os animais infectados e tratados com essa terapia receberam por via tópica, nas patas traseiras direitas, 0,1mL do hidrogel carregado de C-dots, e em seguida, foram submetidas à TFD.

## 3.6 TERAPIA FOTODINÂMICA

### 3.6.1 Esquema Utilizado na TFD

O instrumento utilizado para aplicação da TFD (Figura 8) foi construído pela executora do projeto, de modo que um interruptor quando acionado, ligasse as duas lâmpadas que foram utilizadas ao mesmo tempo por duas pessoas (Figura 9), isso para agilizar a aplicação do tratamento nos camundongos. A lâmpada utilizada foi de LED na cor azul, posicionada a 20cm de altura da base onde a pata do camundongo seria posicionada.

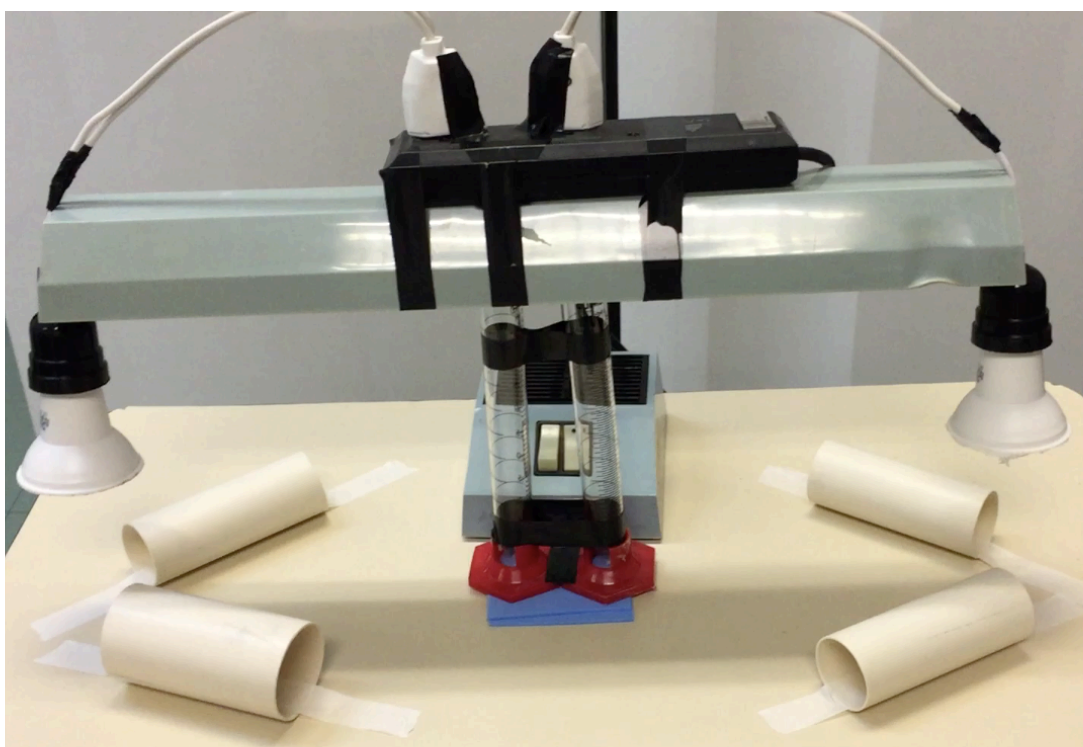


Figura 8 - Instrumento utilizado para aplicação da TFD nas patas infectadas dos camundongos.

Fonte: Acervo pessoal.

Os animais submetidos à TFD foram imobilizados manualmente, de modo a permitir que a pata traseira direita infectada que havia recebido o hidrogel associado

aos C-dots, permanecesse exposta à luz azul durante o período de 10 minutos, tempo mínimo necessário para ação dos C-dots (Figura 10).

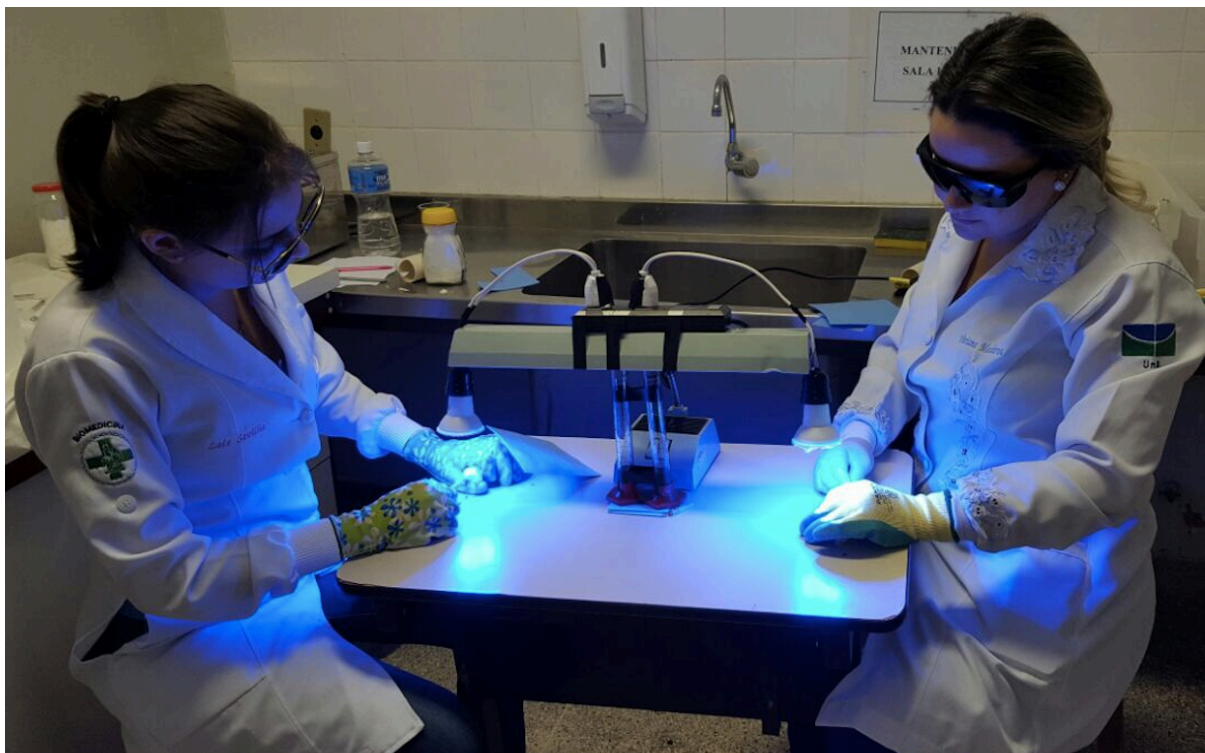


Figura 9 - Ilustração do funcionamento do instrumento utilizado para aplicação da TFD nas patas infectadas dos camundongos.

Fonte: Acervo pessoal.

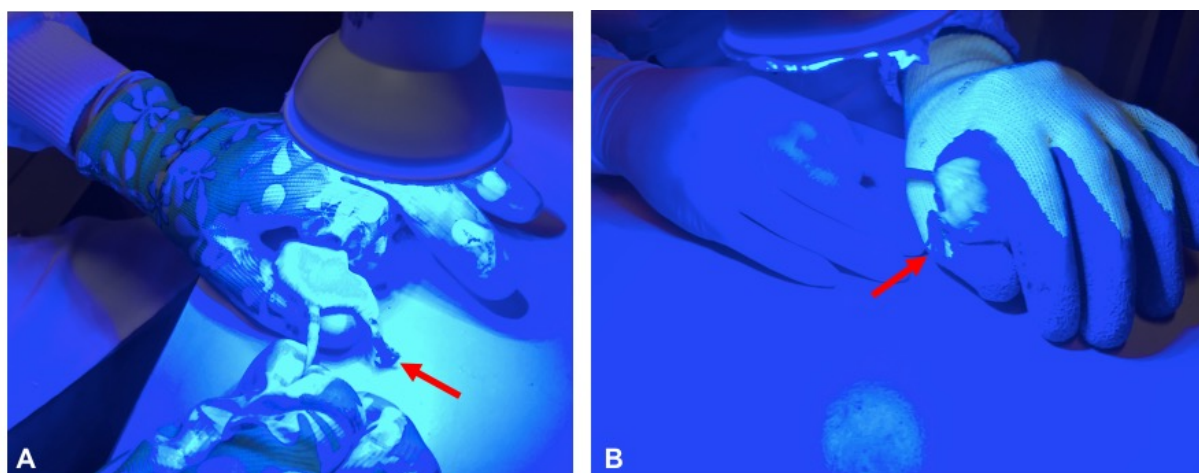


Figura 10 - Imagens da aplicação da TFD nas patas infectadas dos camundongos. A. visão plantar da pata do camundongo. B. visão palmar da pata do camundongo.

Fonte: Acervo pessoal

### 3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram anestesiados com 0,2mL de uma solução preparada com Quetamina (90 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg) e submetidos às coletas para avaliação dos critérios de eficácia conforme descrito no item 3.9 e seus subitens. Após a realização das coletas, ainda anestesiados, os camundongos foram colocados individualmente na câmara de saturação de CO<sub>2</sub>, até que o equipamento atingisse uma saturação superior a 70%, e a parada cardiorrespiratória fosse detectada.

As carcaças dos animais foram descartadas após realização da diluição seriada que será apresentada no item 3.9.1.3, seguindo as normas de descarte preconizadas pela Comissão de Gerenciamento, Tratamento e Destinação de Resíduos Perigosos da Universidade de Brasília (GRP-UnB). As carcaças foram colocadas em sacos plásticos na cor branca, identificados com etiqueta informando espécie do animal, organismo infectante, responsável pelo projeto, e mantidos no freezer do biotério da FM a -20°C até que a coleta fosse feita pela GRP-UnB.

### 3.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA

#### **3.8.1 Critérios Parasitológicos**

##### 3.8.1.1 Diluição Seriada

Após a etapa do tratamento, 2 camundongos de cada grupo foram eutanasiados e as patas infectadas passaram por rigorosa antissepsia antes da sua dissecação. Inicialmente as patas foram lavadas com Clorexidina alcoólica a 0,5%, em seguida, com álcool a 70%, e por último, solução fisiológica. Essa metodologia de antissepsia é a mesma adotada pelo ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) para realização de biópsia e punção da lesão de pacientes com suspeita de leishmaniose. A pata de cada animal foi presa à uma tesoura do tipo “dente de rato” e com auxílio de uma lâmina de bisturi, a pele foi

cuidadosamente retirada, restando o material adequado para a maceração (Figura 11).

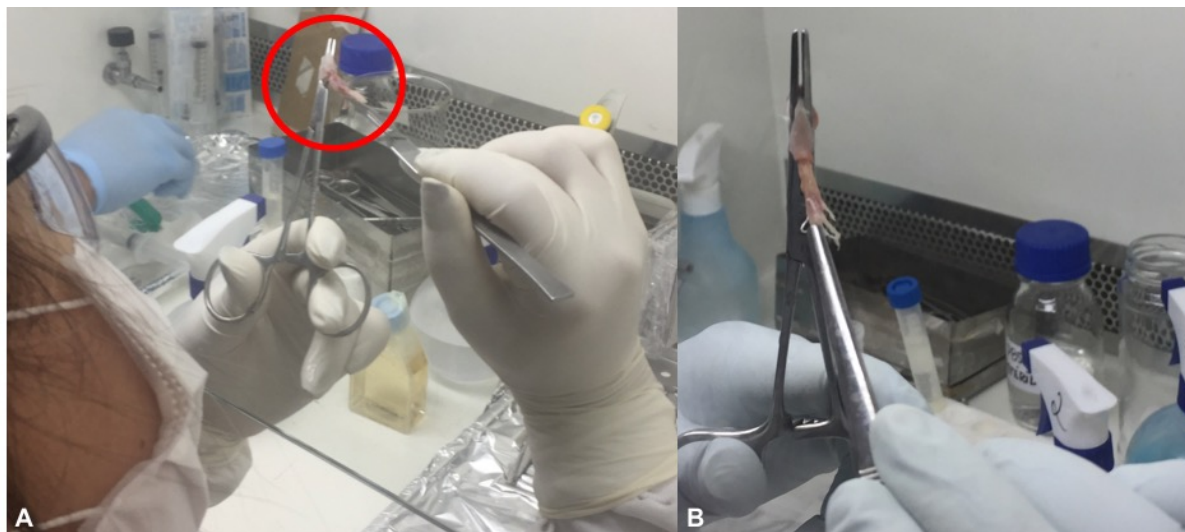


Figura 11 - Ilustração do método de dissecação da pata do camundongo. A. retirada da pele com auxílio da lâmina de bisturi. B. pata exposta após completa dissecação.

Fonte: Acervo pessoal.

Após a dissecação, as duas patas de cada grupo foram colocadas dentro de um homogeneizador de vidro contendo 5mL de meio de cultura *Schneider* (preparado conforme o item 3.3.2) e trituradas com o auxílio da outra parte do homogeneizador (Figura 12).



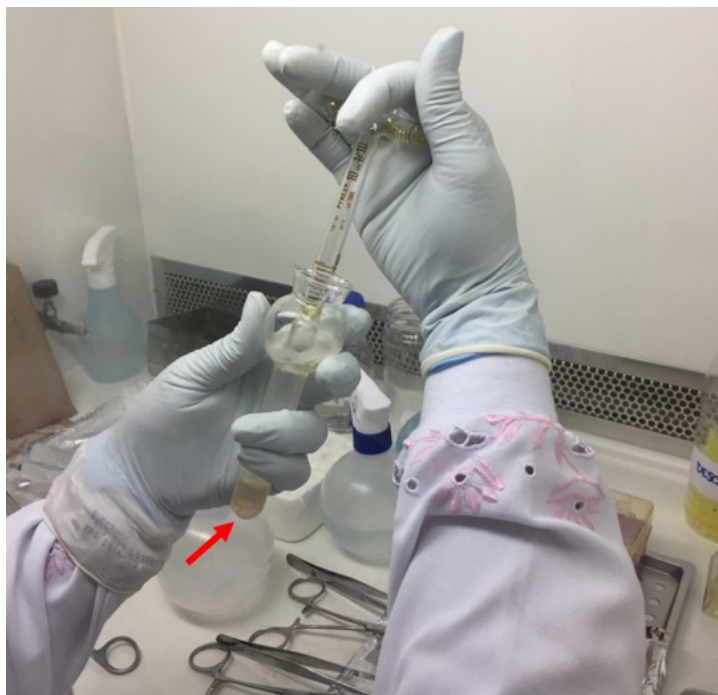


Figura 12 - Ilustração do método de maceração das patas dos camundongos. Detalhe da seta apontando o fundo do macerador onde as patas foram depositadas.

Fonte: Acervo pessoal.

A solução contendo o material macerado foi transferida para um recipiente estéril para que pudesse ser aspirada por uma pipeta multicanal e novamente transferida para a primeira linha da placa de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) de 96 poços. Na linha A da placa foram adicionados em todos os poços 200 $\mu$ L da solução contendo o macerado. Nas demais linhas, de B a H, todos os poços foram preenchidos com 180 $\mu$ L de *Schneider* (preparado). A diluição seriada iniciou-se transferindo 20 $\mu$ L da linha A para a linha B, nesta, realizou-se homogeneização e 20 $\mu$ L foram transferidos para a linha C, o que se repetiu até a linha H, quando após homogeneização, 20 $\mu$ L foram desprezados (Figura 13).

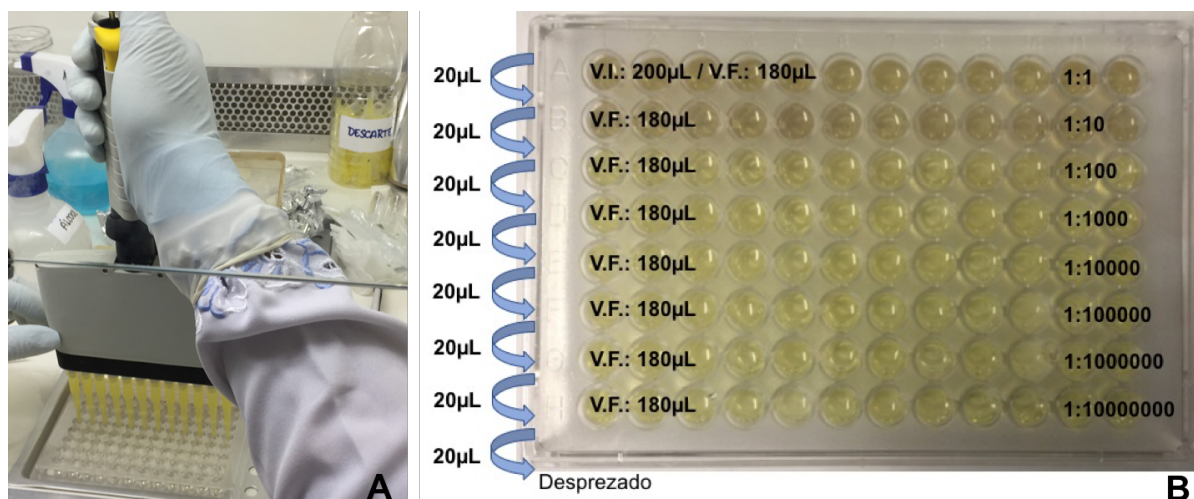


Figura 13 - Metodologia da diluição seriada. A. ilustração da transferência de soluções entre os poços com a pipeta multicanal. B. ilustração da metodologia com representação do Volume Inicial (V.I.), Volume Final (V.F.), quantidade transferida de uma linha para outra.

Fonte: Acervo Pessoal.

### 3.8.1.2 Avaliação da viabilidade celular pela técnica do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT)

Trata-se de uma metodologia que avalia a viabilidade celular (mitocondrial), que é quantificada pela redução do MTT a cristais de *formazan* pela atividade daquelas enzimas. Assim, o processo de redução do MTT à cristais de *formazan* será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

O MTT, sal de coloração amarela e solúvel em água, foi preparado numa concentração de 5mg/mL na capela de fluxo laminar com a luz apagada. Após o período de avaliação das placas pelo método da diluição seriada, foram adicionados 10µL da solução de MTT em todos os poços das placas, estas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas por 4h em temperatura de 22°C. Posteriormente, foram adicionados 100µL de Dimetilsulfóxido P.A. (DMSO) para a liberação dos cristais de *formazan* - sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água. Em seguida, todas as placas foram submetidas à leitura em um espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max, 385 *plus* – USA) no comprimento de onda de 570nm.

### 3.8.1.3 Análise Histopatológica

Após a eutanásia dos animais, e posteriormente à obtenção dos macrófagos peritoneais, os órgãos internos de interesse foram retirados cuidadosamente da cavidade abdominal, para que pudessem ser submetidos à análise histopatológica. Fígado, rins e baço, retirados de cada camundongo foram pesados individualmente em uma balança analítica, e em seguida, pequenos fragmentos foram retirados destes órgãos, para análise molecular. O peso de cada fragmento também foi aferido.

Cada órgão foi colocado em um cassete histológico devidamente identificado, armazenado em solução Davison e mantido sob refrigeração até a próxima etapa de manipulação das amostras. Os fragmentos dos órgãos foram colocados em *eppendorfs* e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração do ácido desoxirribonucleico (DNA).

### 3.8.2 Medição do Diâmetro de Patas

As patas traseiras direitas que receberam o inóculo do concentrado parasitário foram medidas por dois observadores com o auxílio de um paquímetro, a fim de obter uma média do tamanho de cada uma após a infecção e durante o tratamento. As lesões foram medidas em duas posições diferentes, lateralmente e, superior e inferior (Figura 14). A medição ocorreu antes da infecção, 30 dias após, no 1º, 6º e 12º dias de tratamento, seguindo mesmo esquema da pesagem.

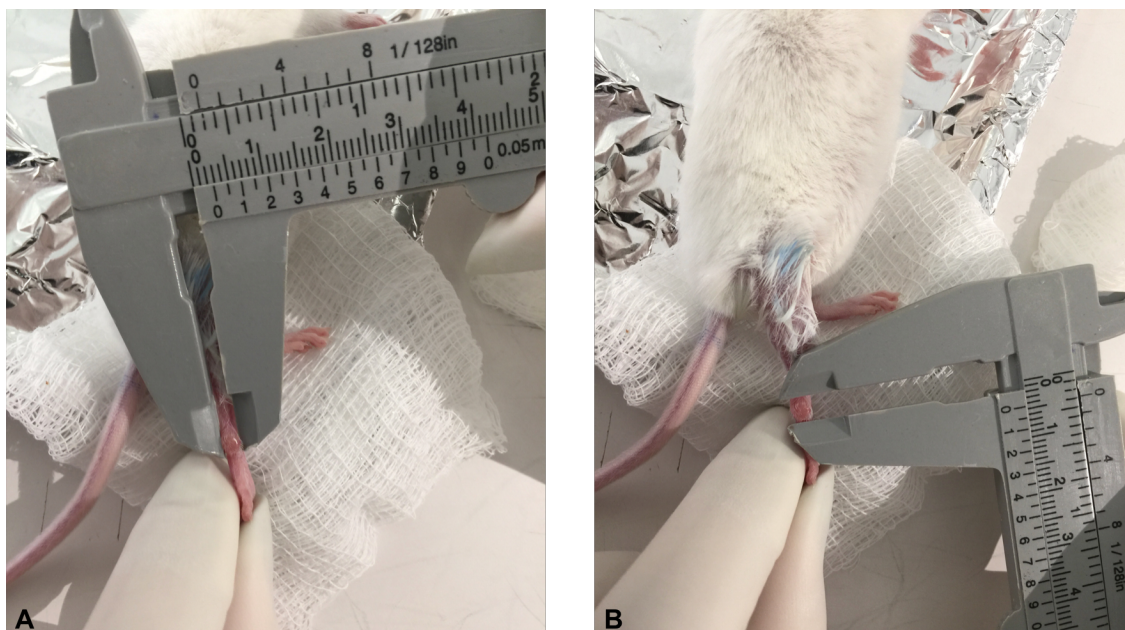


Figura 14 - Demonstração da metodologia utilizada para medição das patas infectadas. A. medição lateral. B. medição superior e inferior.

Fonte: Acervo pessoal.

### 3.8.3 Pesagem dos Camundongos

Todos os animais foram pesados em uma balança analítica obedecendo 5 etapas conforme Fluxograma 1. Nos dias de tratamento, a pesagem foi realizada sempre antes da administração das drogas.



Fluxograma 1 - Pesagem dos animais

### 3.8.4 Critérios Moleculares

#### 3.8.4.1 Extração e Quantificação do DNA dos Macerados das Patas

Após a realização do macerado das patas infectadas, uma alíquota de 200 $\mu$ L foi retirada do homogeneizador e transferida para um *ependorf* que foi armazenado a -80°C até o momento da extração do DNA. Este método foi realizado com o kit comercial *PureLink Genomic DNA* (INVITROGEN, Carlsbad, USA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

A quantificação do DNA das amostras de todos os grupos foi realizada no espectrofotômetro *Nanovue plus* (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), gentilmente cedido pelo Laboratório Interdisciplinar de Biociências da FM da UnB

#### 3.8.4.2 PCR em Tempo Real (qPCR)

No presente estudo foi realizado um ensaio quantitativo de qPCR utilizando SYBR *Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e *primers* capazes de amplificar o kDNA de *Leishmania (V.) braziliensis*, mesma cepa utilizada para infecção dos animais. Os *primers* utilizados na reação foram direcionados aos minicírculos de DNA do cinetoplasto de *Leishmania*, e resultaram em um produto amplificado de 120pb, PPf 5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3' e PPr 5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3' (77).

O resultado da quantificação do DNA foi avaliado, e quando necessário, algumas amostras foram diluídas, a fim de padronizá-las ao limite máximo de 2,5ng/ $\mu$ L. Isto foi necessário visto que o volume de DNA utilizado para a reação de qPCR foi de 4 $\mu$ L, totalizando 10ng de DNA por amostras, estas que receberam adição de 6 $\mu$ L de mix pronto (SYBR *Green* PCR, master mix, primers e água), totalizando 10 $\mu$ L de volume final na reação (Tabela 3). As reações foram realizadas conforme descrito por Sevilha-Santos e colaboradores (66).

A amplificação foi feita com uma temperatura inicial de 95°C por 20 segundos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos, 55°C por 10 segundos e 60°C por 30 segundos (Tabela 4). Posteriormente, as amplificações foram processadas utilizando o termociclador *StepOnePlus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O *melting* foi processado com incrementos de 0,3°C a partir de 55°C a 95°C (66).

Tabela 3 - Sistema utilizado para a amplificação do primer PPr e PPf.

Reagentes	Concentração	Volumes
<b>SYBR Green PCR master mix</b>	1X	5µL
<b>PPr</b>	2mM	0,2µL
<b>PPf</b>	2mM	0,2µL
<b>Água ultrapura</b>	---	0,6µL
<b>DNA</b>	10ng	4µL
<b>Volume final</b>	---	10µL

Fonte: Sevilha-Santos L, dos Santos Júnior ACM, Medeiros-Silva V, Bergmann JO, da Silva EF, Segato LF, et al. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2018;2–7.

Tabela 4 - Sistema utilizado para a amplificação do primer PPr e PPf.

Temperatura	Tempo	Ciclos
<b>95°C</b>	20 s	---
<b>95°C</b>	3 s	40x
<b>55°C</b>	10 s	
<b>60°C</b>	30 s	

Fonte: Sevilha-Santos L, dos Santos Júnior ACM, Medeiros-Silva V, Bergmann JO, da Silva EF, Segato LF, et al. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2018;2–7.

### 3.8.5 Critérios Bioquímicos

Para obtenção das amostras para realização dos exames bioquímicos, os camundongos foram anestesiados e submetidos à uma punção cardíaca, na qual tentou-se obter pelo menos 1mL de sangue de cada um. As coletas de sangue foram realizadas no D7 e D13 do estudo.

Os exames bioquímicos foram realizados pelo Laboratório Clínico SABIN em colaboração ao projeto, e foram possíveis dosar os seguintes exames: Albumina (g/dL), Bilirrubinas Totais (mg/dL), Bilirrubina Direta e Indireta (mg/dL), Creatinina (mg/dL), Fosfatase Alcalina (U/L), Gama GT (U/L), Transaminase Glutâmica Oxalacética - TGO (U/L), Transaminase Glutâmica Pirúvica - TGP (U/L) e Ureia (mg/dL).

### **3.8.6 Critérios Imunológicos**

#### **3.8.6.1 Obtenção dos Macrófagos Peritoneais**

Os animais eutanasiados foram imediatamente transferidos da câmara de saturação de CO<sub>2</sub> para a capela de fluxo laminar, assim, após assepsia da parede abdominal com álcool a 70%, e com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, foi realizada uma incisão na pele para que 10mL de salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, fossem injetados na cavidade abdominal. Posteriormente, uma leve massagem foi realizada no local, e em seguida, com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, a solução de STF contida na cavidade abdominal foi retirada, possibilitando a obtenção dos macrófagos peritoneais. As soluções retiradas foram transferidas para tubos Falcon (estéreis) e centrifugadas em 200G por 10 minutos a 4°C.

Após centrifugação, uma nova lavagem foi realizada e as amostras centrifugadas novamente. Os sobrenadantes foram descartados, e os precipitados foram ressuspensos em 1mL de meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (*Sigma Aldrich*), pH 7,2, suplementado com 20mM de ácido hidroxietil piperazinoetanosulfônico (HEPES) (*Sigma Aldrich*), 2mM de L-glutamina e 40µg/mL de sulfato de gentamicina (solução de RPMI incompleto). Em seguida, com auxílio de uma câmara de Neubauer, os macrófagos peritoneais foram quantificados, e simultaneamente, a viabilidade foi avaliada com solução de nigrosina a 0,05%, sempre maior que 95%. Os macrófagos peritoneais recuperados foram ressuspensos em RPMI (incompleto) para que a solução final apresentasse o número de células necessárias para a realização de cada experimento (78).

### 3.8.6.2 Expressão de Corpúsculos Lipídicos Detectada pela Coloração com Óleo Vermelho O (*Oil Red O*).

Os corpúsculos lipídicos são descritos como estruturas circulares que se coram em vermelho no citoplasma dos monócitos. Para a quantificação destas células foi utilizada a coloração com *oil red O*, que apresenta ampla solubilidade em lipídeos e cora de vermelho os corpúsculos presentes no citoplasma dos monócitos.

Para realizar a aderência das células nas placas de 24 poços, foi necessário obter 2 milhões de células de cada animal, visto que cada um teria amostra em 4 poços da placa, dos quais, dois seriam sensibilizados com lipopolissacarídeo (LPS). Após a quantificação do número de macrófagos peritoneais, um cálculo foi realizado a fim de dividir 500.000 células por poço na placa, cada um com volume final de 500 $\mu$ L. Lamínulas de vidro redondas com 13mm foram colocadas em cada poço no momento da aderência e as placas permaneceram incubadas por 1h. Os poços das placas foram lavados, e logo após, o estímulo de LPS, na concentração de 10ng/mL foi adicionado em dois dos quatro poços referentes a cada animal, nesta etapa a incubação durou 1h. Outra lavagem foi realizada para retirar o excesso de LPS, e em seguida, o meio completo contendo SFB foi adicionado nas placas e incubado por 24h. A placa foi lavada novamente e o sobrenadante reservado para a determinação da produção de óxido nítrico (ON)(79,80).

Após a aderência das células nas lamínulas, estas foram fixadas com paraformaldeído a 2%, por 15 minutos em temperatura ambiente, e em seguida, lavadas duas vezes com STF, e uma vez com álcool isopropílico a 60%. Logo após, as células foram coradas com uma solução de óleo vermelho, por 15 minutos. O excesso de corante foi retirado e os poços foram lavados uma vez com 1mL de álcool isopropílico a 60% e depois duas vezes com 1mL de água destilada. Os núcleos celulares foram corados com hematoxilina de Mayer por 5 minutos, e em seguida, os poços foram lavados novamente com água destilada. Logo após, as lamínulas foram retiradas dos poços das placas com auxílio de uma pinça, e montadas sobre lâminas de vidro em uma fina camada de meio de montagem contendo 10g de gelatina, 60mL de água destilada, 70mL de glicerol e 0,25 g de fenol (79–81).



O procedimento de coloração dos corpúsculos lipídicos com óleo vermelho foi realizado em duplicata para cada grupo de tratamento e grupos controle negativo e positivo. As lâminas foram quantificadas em microscopia ótica com aumento de 1000x, e para cada uma foram contadas 200 células. Com essa contagem foi possível estabelecer a quantidade média de corpúsculos dentro dos macrófagos (MCL), a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma (MØ%) e o índice corpuscular (IC) que é da MCL multiplicada pelo MØ% (79–81).

### 3.8.6.3 Determinação da Produção de ON

A produção do ON, que é um metabólito tóxico para as amastigotas, foi avaliada pela quantificação do nitrito contido nos sobrenadantes das mesmas amostras utilizadas para a avaliação da produção de corpúsculo lipídico. Para efetuar essa dosagem, 100µL dos sobrenadantes foram distribuídos em triplicata, em placas de 96 poços, e acrescentado, em volume igual, o reagente de *Griess* (82). Após 10 min foi feita leitura em espectrofotômetro (Spectramax Plus 384, Molecular Devices) em comprimento de onda de 540nm. Para determinação da concentração de nitrito contida em cada poço, foi feita, paralelamente, uma curva padrão com nitrito diluído em RPMI completo nas concentrações de 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM, 6,25µM, 3,12µM e 1,56µM (80).

## 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foram apresentadas estatísticas descritivas para os dados apresentados por meio de frequência. Os dados numéricos foram avaliados por meio do cálculo da mediana, abrangência dos valores e intervalo interquartil com o objetivo de demonstrar a tendência central e dispersão amostral. As comparações das frequências foram realizadas por testes exatos.

A análise estatística foi realizada no pacote R versão 0.4.9. (<https://CRAN.R-project.org/package=survminer>) no programa livre no R Studio (R Studio:

Desenvolvimento integrado para R. R Studio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>), com base no programa também livre R Core Team (2020). R: Uma linguagem e ambiente para computação estatística. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria. URL <https://www.R-project.org/>. A significância estatística foi definida por um valor de  $p < 0,05$  e por um intervalo de confiança (IC) de 95%. Análise multivariada não foi realizada pelo limitado tamanho amostral.

### 3.10 QUESTÕES ÉTICAS

Os princípios éticos para realização de pesquisa científica com animais de laboratório foram seguidos, conforme a Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO, 1978), os princípios éticos para experimentação animal, definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) e pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. O protocolo experimental empregado nesse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB sob o registro UnBDoc nº 148305/2015 (Anexo 1) e adicionalmente pelo UnBDoc nº 8480/2016 (Anexo 2).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS**

#### **4.1.1 Aspirados em Meio NNN Modificado**

Antes de iniciar o tratamento, foram realizados aspirados das patas dos animais para confirmação da infecção, e as culturas foram observadas continuamente para que fosse observado o crescimento de parasitos. A observação iniciou com 48h, tempo mínimo necessário para o observador conseguir visualizar formas promastigotas de leishmânias, e as culturas continuaram a ser observadas nos períodos seguintes (72h, 96h e 120h) até que a confirmação da infecção pudesse ser atestada. Neste estudo, o tempo máximo de observação dos aspirados foi de 120h para confirmação de positividade para o encontro de parasitos.

Todos os aspirados dos grupos CP, M, P, TFD, MP, PTFD, MTFD e MPTFD apresentaram positividade para o crescimento de parasitos após observação durante os quatro períodos. Os aspirados do grupo CN apresentaram 100% de negatividade para o encontro de parasitos durante os quatro períodos de observação.

#### **4.1.2 Pesquisa de Amastigotas**

Após a observação dos esfregaços, os resultados foram classificados como negativos e positivos, para cada lâmina de camundongo por grupo de tratamento, para confirmação da infecção dos animais. No grupo CN não houve detecção de parasitos em 100% das lâminas, e o oposto foi observado no grupo CP, no qual houve o encontro de parasitos em 100% das lâminas. Nos grupos M, P e MTFD foi possível observar formas amastigotas em 50% das lâminas de cada grupo. Nos grupos TFD e PTFD, 33,3% dos esfregaços observados em cada grupo foram positivos para o encontro de leishmânias. O grupo MP foi que o apresentou a maior quantidade de

lâminas positivas, apresentando 66,6% de esfregaços com presença de parasitos, enquanto o grupo MPTFD foi o que apresentou a menor quantidade de lâminas positivas, apenas 16,6% (Tabela 5).

Tabela 5 - Confirmação da infecção dos animais por meio da pesquisa direta de amastigotas em esfregaços contendo exsudato das patas traseiras direitas dos animais.

	Negativo	Positivo	Total
Grupo CN	6	0	6
Grupo CP	0	6	6
Grupo M	3	3	6
Grupo P	3	3	6
Grupo TFD	4	2	6
Grupo MP	2	4	6
Grupo PTFD	4	2	6
Grupo MTFD	3	3	6
Grupo MPTFD	5	1	6
Total	30	24	54

#### 4.1.3 qPCR Papel Filtro

Com base nos valores dos números de *Leishmanias* encontrados nas amostras de papel filtro, provenientes do extravasamento celular após o aspirado das patas, foram calculadas por grupo de tratamento, a mediana (medida de tendência central), valores mínimos - máximos e o intervalo interquartil. Não houve quantificação de parasitos no grupo CN (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da qPCR realizada a partir de amostras de papel filtro para confirmação da infecção.

	<b>Número de leishmânias detectadas em papel filtro</b>		
	<b>Mediana</b>	<b>Min - Max</b>	<b>Intervalo interquartil</b>
<b>Grupo CN</b>	0	0 - 0	0
<b>Grupo CP</b>	6	0 - 2336	329
<b>Grupo M</b>	2119	0 - 29767	5806
<b>Grupo P</b>	902	13 - 18077	3163
<b>Grupo TFD</b>	65	7 - 8976	2361
<b>Grupo MP</b>	218	8 - 53861	36141
<b>Grupo PTFD</b>	115	43 - 1286	107
<b>Grupo MTFD</b>	493	11 - 7400	460
<b>Grupo MPTFD</b>	343	59 - 15393	6198

## 4.2 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA

### 4.2.1 Critérios Parasitológicos

#### 4.2.1.1 Aspirados em Meio NNN Modificado para Avaliação de Cura Parasitológica

No D7, 100% dos aspirados dos grupos CP, M, P, TFD, MP, PTFD, MTFD e MPTFD apresentaram positividade para o crescimento de parasitos durante as primeiras 120h após o preparo (48h, 72h, 96h e 120h). Apenas os aspirados do grupo CN apresentaram-se 100% negativos, conforme esperado.

Os aspirados dos grupos CP e P apresentaram 100% de positividade após 48h do preparo. Nos grupos M e MPTFD, 100% dos aspirados apresentaram positividade com 120h após o preparo. No grupo TFD, 50% dos aspirados apresentaram-se positivos com 48h, aumentando para 100% com 72h. Os aspirados do grupo MP apresentaram crescimento de parasitos em 50% das amostras com 96h, e com 120h, 100% apresentou positividade. No grupo PTFD, 50% dos aspirados apresentaram-se

positivos com 48h, e 100% de positividade com 96h. O grupo MTFD apresentou 50% de positividade com 72h, e 100% de positividade com 120h.

Em relação ao D13, os aspirados dos grupos CN, M, MP e MTFD apresentaram 100% de negatividade para o encontro de parasitos durante 30 dias de observação, tempo mínimo estabelecido pelo Laboratório de Dermatocologia para que a cultura seja considerada negativa, após o preparo. Nos grupos CP e PTFD houve 100% de positividade com 48h observação. Os aspirados dos grupos P e TFD apresentaram 50% de positividade com 48h, e atingiram 100% de positividade com 96h.

Ao final dos 12 dias de tratamento, alguns animais não resistiram e determinados grupos tiveram perdas. No D13, os grupos M, MP e MTFD contabilizaram apenas 1 camundongo por grupo disponível para análise, e no grupo MPTFD, não restou nenhum animal.

#### 4.2.1.2 Pesquisa de Amastigotas

A Tabela 7, referente aos resultados das leituras dos esfregaços de pesquisa de amastigotas no D7, mostra que nos grupos CN, M, TFD, MP, PTFD, MTFD e MPTFD não houve detecção de parasitos em 100% das lâminas de cada grupo. No grupo CP o encontro de parasitos foi observado em 100% das lâminas. O grupo P apresentou 50% de positividade para o encontro de leishmânias nas lâminas observadas.

Na Tabela 8, referente aos resultados das leituras dos esfregaços de pesquisa de amastigotas no D13, é possível observar que o grupo CN e o grupo CP apresentaram os mesmos resultados do D7, onde 100% das lâminas de cada grupo foram negativas e positivas, respectivamente. Nos esfregaços dos grupos M, P, TFD, MP, PTFD e MTFD não houve detecção de parasitos em 100% das lâminas observadas de cada grupo.

Tabela 7 - Resultados das leituras dos esfregaços de pesquisa de amastigotas como critério de avaliação de eficácia no D7.

	<b>Número de esfregaços de pesquisa de amastigotas</b>	
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
<b>Grupo CN</b>	2/2	
<b>Grupo CP</b>		2/2
<b>Grupo M</b>	2/2	
<b>Grupo P</b>	2/2	
<b>Grupo TFD</b>	2/2	
<b>Grupo MP</b>	2/2	
<b>Grupo PTFD</b>	2/2	
<b>Grupo MTFD</b>	2/2	
<b>Grupo MPTFD</b>	2/2	

Tabela 8 - Resultados das leituras dos esfregaços de pesquisa de amastigotas como critério de avaliação de eficácia no D13.

	<b>Número de esfregaços de pesquisa de amastigotas</b>	
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
<b>Grupo CN</b>	2/2	
<b>Grupo CP</b>		2/2
<b>Grupo M</b>	1/1	
<b>Grupo P</b>	2/2	
<b>Grupo TFD</b>	2/2	
<b>Grupo MP</b>	1/1	
<b>Grupo PTFD</b>	2/2	
<b>Grupo MTFD</b>	1/1	

#### 4.2.1.3 Diluição Seriada e MTT

Todas as placas realizadas nos dois períodos de avaliação, D7 e D13, foram observadas em microscópio de luz invertida e os 96 poços foram lidos individualmente para constatação do crescimento ou não de leishmânias. À medida em que as formas promastigotas eram observadas, o poço da placa era identificado com a marcação de positivo. A observação das placas foi realizada por 5 dias consecutivos, e em seguida foram submetidas à avaliação de viabilidade celular pelo MTT. Para análise dos dados, criou-se um modelo de tabela semelhante às placas, assim, os dados poderiam ser exportados para o software *Extreme Limiting Dilution Analysis* (ELDA) e analisados estatisticamente.

No D7, após 6 dias de tratamento, foram realizadas 9 placas referentes aos grupos de animais, cada uma contendo amostras de 2 camundongos de cada grupo. No grupo CN, na avaliação D7, todos os poços da placa permaneceram negativos para o crescimento de parasitos durante o período de observação, resultado esperado para o grupo controle negativo que não havia sido infectado. No mesmo período de avaliação, no grupo CP, todos os poços da placa apresentaram crescimento parasitos durante o período de observação, o que confirma a infecção dos animais e a estabilidade dos mesmos.

No grupo M, avaliação D7, foi possível identificar poços positivos com crescimento de parasitos até a diluição 1/100. Em relação aos grupos P e TFD, no mesmo período, todos os poços das placas apresentaram crescimento de *Leishmanias*. No grupo MP, avaliação D7, a maioria dos poços apresentou crescimento de parasitos, inclusive no último poço com título da diluição de 1/10000000. Nos grupos PTFD e grupo MTFD, respectivamente, período D7, o crescimento de parasitos foi similar, com uma pequena redução no último grupo. No grupo MPTFD, avaliação D7, a maioria dos poços da placa de 96 poços não apresentaram crescimento parasitos, este que foi observado apenas até a diluição 1/100.

Na análise estatística os grupos P, TFD e PTFD apresentaram resultados semelhantes ao CP (Tabela 9).



Tabela 9 - Análise estatística dos resultados do MTT durante o D7 de tratamento.

<b>GRUPO</b>	<b>GRUPO COMPARADOR</b>	<b>P-VALOR</b>
CN	CP	<0,001
CN	M	<0,001
CN	P	<0,001
CN	TFD	<0,001
CN	MP	<0,001
CN	PTFD	<0,001
CN	MTFD	<0,001
CN	MPTFD	<0,001
CP	M	<0,001
CP	P	1
CP	TFD	1
CP	MP	<0,001
CP	PTFD	0
CP	MTFD	<0,001
CP	MPTFD	<0,001
M	P	<0,001
M	TFD	<0,001
M	MP	<0,001
M	PTFD	<0,001
M	MTFD	0,08
M	MPTFD	0,01
P	TFD	1
P	MP	<0,001
P	PTFD	0
P	MTFD	<0,001
P	MPTFD	<0,001
TFD	MP	<0,001
TFD	PTFD	0
TFD	MTFD	<0,001
TFD	MPTFD	<0,001
MP	PTFD	0
MP	MTFD	<0,001
MP	MPTFD	<0,001
PTFD	MTFD	<0,001
PTFD	MPTFD	<0,001
MTFD	MPTFD	<0,001

No grupo CP e ao D13 de tratamento, 89 poços da placa apresentaram crescimento parasitos, o que não foi observado em dois poços da diluição 1|10000000. Nesta placa houve crescimento de fungos em 5 poços, 2 na diluição 1/1, 2 na diluição 1/10 e 1 na diluição 1/1000. No grupo M e ao D13 de tratamento, 95 poços da placa de 96 poços não apresentaram crescimento de parasitos, porém, em um poço da primeira diluição constatou-se crescimento de fungos. No grupo P e ao D13 de tratamento, a maioria dos poços apresentou crescimento de parasitos, e alguns poços negativos nas duas últimas diluições. Foi possível observar crescimento de fungos em 2 poços da primeira diluição, 1 poço da diluição 1/1000, 1 poço na penúltima diluição. No grupo TFD e ao D13 de tratamento, 94 poços apresentaram crescimento de parasitos, e 2 poços apresentaram crescimento de fungos, 1 poço na primeira e 1 poço na diluição 1/100. No grupo MP e ao D13 de tratamento, 94 poços não apresentaram crescimento de parasitos, e em 2 poços da primeira diluição houve crescimento de fungos.

No grupo PTFD e ao D13 de tratamento, 94 poços apresentaram crescimento de parasitos, o que não ocorreu em 1 poço da última diluição. Em 3 poços houve crescimento de fungos, na primeira, segunda e terceira diluições. No grupo MPTFD e ao D13 de tratamento, 95 poços não apresentaram crescimento de parasitos, e 1 poço apresentou crescimento de fungos na primeira diluição.

Na análise estatística os grupos P, TFD e PTFD apresentaram resultados semelhantes ao CP (tabela 10). O grupo MTFD e MP apresentaram resultados comparáveis ao controle negativo no D13. O grupo MTFD apresentou menor quantidade de *Leishmanias* viáveis em comparação ao grupo M ( $p < 0,001$ ).

Tabela 10 - Análise estatísticas dos resultados do MTT durante no D13 de tratamento.

<b>GRUPO</b>	<b>GRUPO COMPARADOR</b>	<b>P-VALOR</b>
<b>CN</b>	CP	<0,001
<b>CN</b>	M	<0,001
<b>CN</b>	P	<0,001
<b>CN</b>	TFD	<0,001
<b>CN</b>	MP	1
<b>CN</b>	PTFD	<0,001
<b>CN</b>	MTFD	1
<b>CP</b>	M	0,001
<b>CP</b>	P	0,0856
<b>CP</b>	TFD	0,0856
<b>CP</b>	MP	<0,001
<b>CP</b>	PTFD	0,534
<b>CP</b>	MTFD	<0,001
<b>M</b>	P	<0,001
<b>M</b>	TFD	<0,001
<b>M</b>	MP	<0,001
<b>M</b>	PTFD	<0,001
<b>M</b>	MTFD	<0,001
<b>P</b>	TFD	1
<b>P</b>	MP	<0,001
<b>P</b>	PTFD	<0,001
<b>P</b>	MTFD	<0,001
<b>TFD</b>	MP	<0,001
<b>TFD</b>	PTFD	0,232
<b>TFD</b>	MTFD	<0,001
<b>MP</b>	PTFD	<0,001
<b>MP</b>	MTFD	1
<b>PTFD</b>	MTFD	<0,001

#### 4.2.2 Medição do Diâmetro de Patas

O diâmetro das patas dos animais, por grupo de tratamento, foi aferido por dois observadores e anotado em milímetros, conforme escala do paquímetro utilizado. Com base nos valores aferidos pelos dois observadores foram calculados, a média, mediana, valores mínimo e máximo, e intervalo interquartil para os dois tipos de medição: lateral (Tabela 11) e, superior e inferior (Tabela 12).

No primeiro dia de tratamento, antes do início da administração das drogas, dois animais, um do grupo MP e um do grupo MPTFD, morreram após a anestesia. No D6, antes da administração das drogas, três animais do grupo MTFD também morreram. No grupo MPTFD, não houve medição das patas no D12 porque não havia animais vivos nesta etapa de avaliação, visto que um animal morreu no D1, dois animais foram eutanasiados no D7, e os outros três animais morreram durante o período de tratamento.

Tabela 11 - Resultados da medição do diâmetro (mm) lateral das patas dos camundongos nas etapas de inoculação, 30 dias após a inoculação, D1, D6 e D12 de tratamento.

		<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min-Máx</b>
IN	CN	0,28	0,28	0,25-0,30
	CP	0,28	0,28	0,20-0,35
	M	0,26	0,25	0,20-0,30
	P	0,29	0,30	0,25-0,30
	TFD	0,28	0,30	0,25-0,30
	MP	0,26	0,25	0,20-0,30
	PTFD	0,27	0,30	0,20-0,30
	MTFD	0,26	0,30	0,20-0,30
	MPTFD	0,23	0,30	0,20-0,30
30IN	CN	0,32	0,30	0,30-0,35
	CP	0,29	0,30	0,25-0,30
	M	0,33	0,33	0,30-0,40
	P	0,31	0,30	0,30-0,35
	TFD	0,33	0,30	0,30-0,40
	MP	0,33	0,33	0,30-0,35
	PTFD	0,31	0,30	0,30-0,35
	MTFD	0,32	0,30	0,30-0,35
	MPTFD	0,32	0,30	0,30-0,35
D1	CN	0,33	0,33	0,30-0,40
	CP	0,31	0,30	0,30-0,35
	M	0,32	0,30	0,30-0,35
	P	0,31	0,30	0,30-0,35
	TFD	0,30	0,30	0,30
	MP	0,33	0,30	0,30-0,45
	PTFD	0,30	0,30	0,30
	MTFD	0,31	0,30	0,30-0,45
	MPTFD	0,31	0,30	0,30-0,45
D6	CN	0,31	0,30	0,30-0,35
	CP	0,31	0,30	0,30-0,35
	M	0,31	0,30	0,30-0,35
	P	0,33	0,33	0,30-0,35
	TFD	0,32	0,30	0,30-0,35
	MP	0,32	0,30	0,30-0,35
	PTFD	0,32	0,30	0,30-0,35
	MTFD	0,30	0,30	0,30
	MPTFD	0,30	0,30	0,30
D12	CN	0,30	0,30	0,30
	CP	0,30	0,30	0,30
	M	0,30	0,30	0,30
	P	0,34	0,33	0,30-0,40
	TFD	0,30	0,30	0,30
	MP	0,30	0,30	0,30
	PTFD	0,33	0,30	0,30-0,40
	MTFD	0,30	0,25	0,30

IN: Inoculação;

30IN: 30 dias após a inoculação.

Tabela 12 - Resultados da medição do diâmetro (mm) superior/inferior das patas dos camundongos nas etapas de inoculação, 30 dias após a inoculação, D1, D6 e D12 de tratamento.

		<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min-Máx</b>
IN	CN	0,35	0,35	0,35-0,40
	CP	0,33	0,30	0,30-0,40
	M	0,35	0,35	0,30-0,40
	P	0,32	0,30	0,30-0,35
	TFD	0,33	0,30	0,30-0,40
	MP	0,3	0,30	0,30
	PTFD	0,32	0,30	0,30-0,35
	MTFD	0,30	0,30	0,30
	MPTFD	0,31	0,30	0,30-0,35
30IN	CN	0,39	0,40	0,35-0,40
	CP	0,39	0,40	0,35-0,40
	M	0,38	0,40	0,35-0,40
	P	0,41	0,40	0,40-0,45
	TFD	0,41	0,40	0,40-0,45
	MP	0,42	0,40	0,40-0,45
	PTFD	0,42	0,40	0,40-0,45
	MTFD	0,41	0,40	0,40-0,45
	MPTFD	0,41	0,40	0,40-0,45
D1	CN	0,39	0,40	0,35-0,40
	CP	0,40	0,40	0,40
	M	0,39	0,40	0,35-0,40
	P	0,39	0,40	0,40
	TFD	0,40	0,40	0,35-0,45
	MP	0,38	0,40	0,30-0,45
	PTFD	0,39	0,40	0,35-0,40
	MTFD	0,40	0,40	0,40
	MPTFD	0,40	0,40	0,40
D6	CN	0,40	0,40	0,40
	CP	0,40	0,40	0,40-0,45
	M	0,39	0,40	0,35-0,40
	P	0,41	0,40	0,40-0,45
	TFD	0,39	0,40	0,35-0,40
	MP	0,40	0,40	0,40
	PTFD	0,38	0,40	0,35-0,40
	MTFD	0,40	0,40	0,40
	MPTFD	0,40	0,40	0,40
D12	CN	0,39	0,40	0,35-0,40
	CP	0,36	0,38	0,30-0,40
	M	0,40	0,40	0,40
	P	0,41	0,40	0,40-0,45
	TFD	0,38	0,38	0,35-0,40
	MP	0,30	0,30	0,30
	PTFD	0,39	0,40	0,35-0,40
	MTFD	0,40	0,40	0,40

IN: Inoculação;  
30IN: 30 dias após a inoculação.

### 4.2.3 Pesagem dos Camundongos

Todos os animais foram pesados antes da inoculação e 30 dias após, no 1º dia antes de iniciar o tratamento, no 6º e 12º dias de tratamento, antes da administração das drogas. Os números apresentados na Tabela 13 representam a aferição do peso em gramas (g), conforme escala da balança utilizada para pesagem dos animais.

A média de peso dos camundongos por grupo foi realizada para aferir as oscilações de perda e/ou ganho de peso dos grupos e entre eles durante o tratamento (Tabela 14).

Tabela 13 - Resultados das pesagens (g) dos camundongos por grupo nas etapas de inoculação, 30 dias após a inoculação, D1, D6 e D12 de tratamento.

	Camundongo	Grupo CN	Grupo CP	Grupo M	Grupo P	Grupo TFD	Grupo MP	Grupo PTFD	Grupo MTFD	Grupo MPTFD
Inoculação	I	25,5	27,4	25,0	29,4	25,1	27,4	28,2	25,7	24,6
	II	27,9	26,1	27,0	34,4	38,3	25,6	27,7	25,5	25,2
	III	26,9	23,5	26,6	29,1	24,6	25,3	27,7	25,2	25,4
	IV	25,6	21,9	25,3	28,2	27,4	26,8	28,2	29,7	27,5
	V	23,9	25,2	32,9	25,6	26,6	26,0	33,2	25,3	24,6
	VI	25,5	28,8	27,3	24,9	28,2	29,4	22,4	26,7	26,3
30 dias	I	26,2	27,7	26,2	29,9	26,3	28,0	28,3	26,9	24,9
	II	29,3	27,8	28,2	36,2	38,8	26,8	28,1	26,8	26,3
	III	27,3	25,4	28,1	29,2	26,2	27,2	29,8	25,9	26,0
	IV	26,0	23,8	25,6	30,0	27,1	27,1	30,4	30,5	27,4
	V	25,5	27,3	34,0	26,8	27,7	23,4	33,2	26,0	25,8
	VI	25,8	30,8	23,2	26,2	28,7	29,4	23,5	27,6	28,1
D1	I	27,5	28,6	27,7	29,9	28,3	29,9	29,2	27,6	26,7
	II	30,1	27,5	28,6	36,4	36,9	27,4	29,6	28,9	27,6
	III	29,0	25,1	28,7	29,4	27,3	28,6	29,6	26,7	26,9
	IV	26,5	25,2	26,4	30,0	27,3	29,2	29,7	31,1	P
	V	25,8	29,6	35,7	26,8	28,2	P	33,4	27,0	26,1
	VI	26,8	30,6	29,3	27,2	30,4	31,3	23,9	28,0	28,5
D6	I	26,6	28,0	25,9	28,7	26,4	25,9	27,8	P	24,5
	II	28,2	26,4	22,3	35,4	33,9	22,8	28,9	24,3	23,6
	III	27,1	24,6	27,4	28,2	24,4	25,4	27,8	24,8	25,0
	IV	25,1	23,8	21,5	28,5	26,8	24,4	27,5	P	P
	V	25,0	28,3	31,9	26,3	27,0	P	31,0	P	21,6
	VI	25,9	29,0	24,0	26,3	28,8	25,9	23,2	25,5	24,7
D12	I	E	E	E	E	E	E	E	P	E
	II	28,1	28,0	E	35,6	E	E	28,0	E	E
	III	28,4	25,1	27,1	28,1	25,3	23,8	26,9	22,7	E
	IV	E	E	E	E	E	E	E	P	P
	V	24,3	28,1	26,3	27,7	E	P	29,9	P	E
	VI	25,9	29,5	E	25,8	29,2	E	22,9	E	E

P: perdas durante o período de tratamento. E: eutanásia dos animais para avaliação do tratamento.



Tabela 14 - Resultados das médias das pesagens dos camundongos por grupo nas etapas de inoculação, 30 dias após a inoculação, D1, D6 e D12 de tratamento.

	Inoculação	30 dias após a inoculação	D1	D6	D12
Grupo CN	25,9	26,7	27,6	26,3	26,7
Grupo CP	25,5	27,1	27,8	26,7	27,7
Grupo M	27,4	27,6	29,4	25,5	26,7
Grupo P	28,6	29,7	30,0	28,9	29,3
Grupo TFD	28,4	29,1	29,7	27,9	27,3
Grupo MP	26,8	27,0	29,3	24,9	23,8
Grupo PTFD	27,9	28,9	29,2	27,7	26,9
Grupo MTFD	26,4	27,3	28,2	24,9	22,7
Grupo MPTFD	25,6	26,4	27,2	23,9	

#### 4.2.4 Critérios Moleculares

##### 4.2.4.1 qPCR

Os resultados da quantificação das amostras apresentados na Tabela 15 foram obtidos a partir da construção de uma curva padrão desenvolvida com a cepa de referência de *L. (V.) braziliensis*. A curva padrão foi realizada em triplicata com amostras de *L. (V.) braziliensis* ( $R^2 = 0.981$ , eficiência = 94.615, declive = -3.458) (83) (Figura 15). A partir dessa curva, foi possível determinar um limite mínimo de detecção de 12,02 leishmânias (32Mb, 70fg por seu genoma diploide) tendo como base o tamanho do genoma haploide de *L. (V.) braziliensis* e considerado 83,15fg do DNA de *Leishmania* como sendo equivalente a um parasito (84).

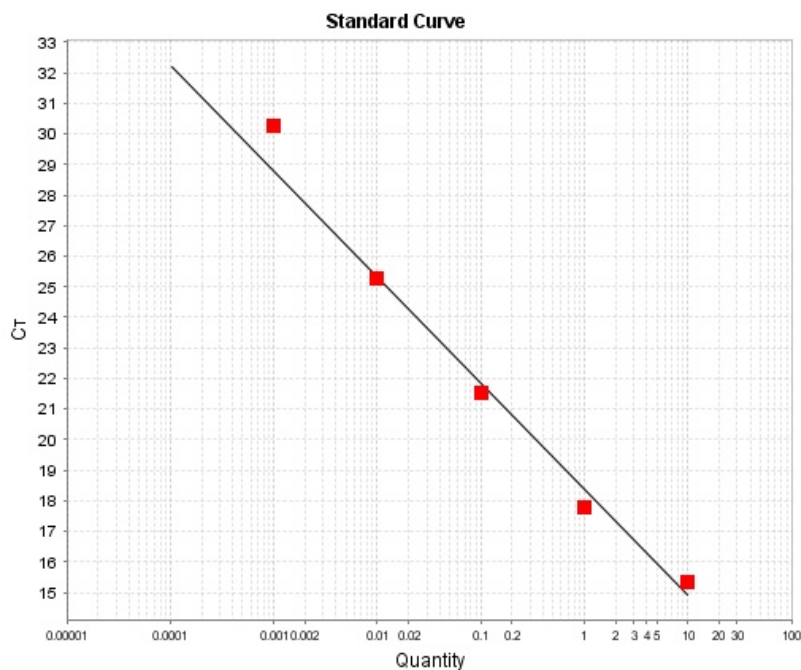


Figura 15 - Curva padrão construída com *L. (V.) braziliensis*, demonstrando a média dos Cq da diluição seriada.

Fonte: Dados da Pesquisa.

A partir da curva padrão, foi possível construir uma curva de referência capaz de demonstrar os números absolutos de leishmânias em cada ponto da diluição do DNA de *L. (V.) braziliensis* (ng), bem como os valores de Cq, Tm, correspondentes a estes pontos (Figura 16).

Os resultados da quantificação das 2 amostras de cada grupo (*pool*) foram obtidos após análise em triplicata e realização da média dos valores, o que possibilitou a conversão do valor encontrado para o número absoluto de leishmânias por grupo e período de tratamento (Tabela 15).

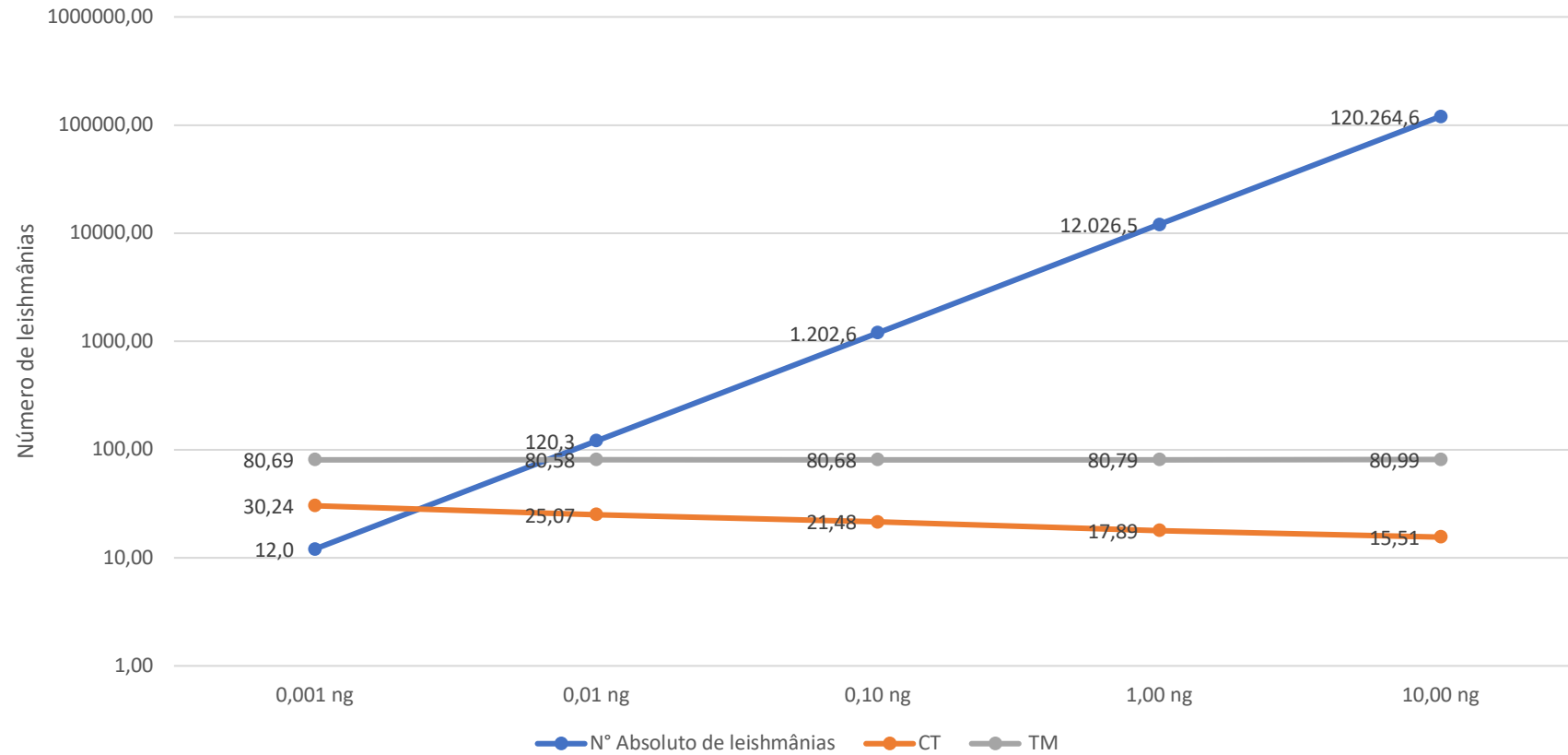


Figura 16 - Curva de referência composta pelos números absolutos de leishmânias em cada ponto da diluição da curva padrão, valores de Cq e Tm.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Tabela 15 - Resultados da quantificação do DNA de *Leishmania braziliensis* das amostras dos macerados das patas dos camundongos por grupos de tratamento e período de eutanásia.

Grupo	Eutanásia	Resultado (ng)			Média (ng)	Conversão (fg)	Conversão nº de leishmânias	CT	Média CT			TM	Média TM		
		A	B	C					A	B	C		A	B	C
CN	D7	0	0	0	0	0,00	0		30,69	28,85	29,77		81,13	80,23	80,68
	D13	0	0	0	0	0,00	0	31,99	32,19	31,69	31,96	80,98	80,83	80,98	80,93
CP	D7	0,27	0,26	0,29	0,27	273333,33	3287,23	20,39	20,44	20,25	20,36	81,89	81,74	81,88	81,84
	D13	0,18	0,13	0,18	0,16	163333,33	1964,32	20,94	21,48	20,95	21,12	81,88	82,03	82,03	81,98
M	D7	0	0	0	0	0,00	0,00	28,21	20,13	20,09	22,81	81,88	81,88	81,88	81,88
	D13	0	0	0	0	0,00	0,00	29,95	30,29	30,02	30,09	80,23	80,08	80,08	80,13
P	D7	5,62	5,38	5,85	5,62	5616666,67	67548,61	15,81	15,87	15,75	15,81	81,89	81,74	81,88	81,84
	D13	0,57	0,58	0,61	0,59	586666,67	7055,52	19,24	19,21	19,13	19,19	81,88	81,88	81,88	81,88
TFD	D7	0,26	0,26	0,28	0,27	266666,67	3207,06	20,42	20,44	20,33	20,40	81,73	81,73	81,73	81,73
	D13	0,32	0,33	0,46	0,37	370000,00	4449,79	20,09	20,05	19,57	19,90	81,73	81,58	81,58	81,63
MP	D7	0,05	0,05	0,05	0,05	50000,00	601,32	22,98	22,98	22,79	22,92	81,89	81,74	81,88	81,84
	D13	0	0	0	0	0,00	0	26,61	29,65	29,64	28,63	81,28	81,29	81,14	81,24
PTFD	D7	0,13	0,02	0,05	0,07	66666,67	801,76	21,45	23,97	23,03	22,82	81,58	81,58	81,73	81,63
	D13	0,31	0,27	0,29	0,29	290000,00	3487,67	20,18	20,38	20,24	20,27	81,88	81,73	81,73	81,78
MTFD	D7	0,01	0,01	0,01	0,01	10000,00	120,26	24,91	24,84	24,86	24,87	81,89	81,89	81,88	81,89
	D13	0	0	0	0	0,00	0	20,00	28,01	23,36	23,79	80,68	80,69	80,84	80,74
MPTFD	D7	0,01	0,01	0,01	0,01	10000,00	120,26	25,83	25,88	25,81	25,84	81,43	81,43	81,43	81,43

No D7, foi possível confirmar a negatividade em relação ao encontro de parasitos no grupo CN, e a positividade do grupo CP, que apresentou 3.287 leishmânias. O grupo M, não apresentou parasitos de acordo com o limite mínimo de detecção. O grupo P foi o que apresentou um número surpreendente de leishmânias quando comparado aos outros grupos de tratamento, 67.548 parasitos. O grupo TFD apresentou 3.207 parasitos, seguido do grupo MP com 601 parasitos, grupo PTFD com 801 parasitos, e grupo MTFD e grupo MPTFD, ambos com 120 parasitos.

No D13, o grupo CN apresentou o mesmo resultado do D7, confirmando a negatividade para o encontro de parasitos. O grupo CP apresentou 1.964 parasitos, constatando-se uma redução do número de leishmânias quando comparado ao período anterior. No grupo M, novamente não foram detectados parasitos conforme o limite mínimo de detecção. Nesta etapa, o grupo P apresentou 7.055 leishmânias, uma queda brusca em relação ao número de parasitos detectados no primeiro período. O grupo TFD apresentou 4.449 parasitos nesta fase, um aumento do número de leishmânias quando comparado ao período anterior. O grupo MP e o grupo H MTFD não apresentaram parasitos de acordo com o limite mínimo de detecção. No grupo PTFD, que apresentou o número de 3.487 parasitos, foi possível detectar um aumento considerável em relação o primeiro período. Nesta etapa, o grupo MPTFD não foi avaliado por não ter amostra disponível para análise.

Os dados descritos anteriormente podem ser observados na Figura 17, que apresenta os números absolutos da quantificação do número de parasitos por grupo de tratamento no D7 e no D13.

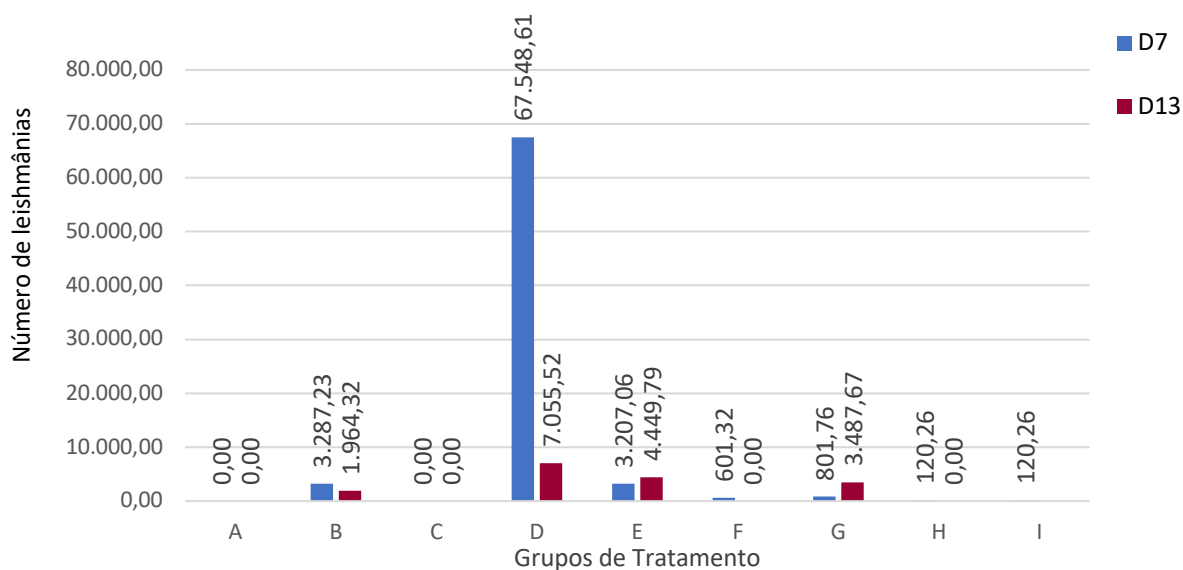


Figura 17 - Quantificação das amostras dos grupos de tratamento por meio da qPCR com valores absolutos do número de leishmânias no D7 e no D13.

**A:** grupo CN; **B:** grupo CP; **C:** grupo M; **D:** grupo P; **E:** grupo TFD; **F:** grupo MP; **G:** grupo PTFD; **H:** grupo MTFD; **I:** grupo MPTFD.

#### 4.2.5 Critérios Bioquímicos

A Tabela 16 e a Tabela 17, mostram os resultados das análises bioquímicas realizadas com as amostras sanguíneas dos animais referentes aos grupos de tratamento no período D7 e D13, respectivamente.

Tabela 16 - Resultados das análises bioquímicas das amostras dos grupos de tratamento no D7.

	Albumina (g/dL)	Bilirrubinas			Creatinina (mg/dL)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Gama GT (U/L)	TGO (UI/L)	TGP (UI/L)	Ureia (mg/dL)
		Totais (mg/dL)	Direta (mg/dL)	Indireta (mg/dL)						
CN	2,9	0,02	0,01	0,01	< 0,2	93,0	1	79	29	58
CN	2,9	0,02	0,01	0,01	< 0,2	91,0	1	144	40	63
CP	3,0	0,02	0,01	0,01	< 0,2	68,0	1	236	31	61
TFD	3,0	0,03	0,02	0,01	< 0,2	95,0	1	71	27	55
TFD	2,6	0,02	0,01	0,01	< 0,2	84,0	1	183	72	51
MP	2,5	0,02	0,01	0,01	< 0,2	85,0	1	102	92	50
PTFD	2,8	0,04	0,03	0,01	< 0,2	103,0	1	93	26	52
PTFD	2,7	0,04	0,03	0,01	< 0,2	109,0	1	74	19	42
MTFD	2,6	0,02	0,01	0,01	< 0,2	84,0	1	135	117	61
MPTFD	2,1	0,03	0,02	0,01	< 0,2	96,0	1	291	239	49

Tabela 17 - Resultados das análises bioquímicas das amostras dos grupos de tratamento no D13.

	Albumina (g/dL)	Bilirrubinas			Creatinina (mg/dL)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Gama GT (U/L)	TGO (UI/L)	TGP (UI/L)	Ureia (mg/dL)
		Totais (mg/dL)	Direta (mg/dL)	Indireta (mg/dL)						
CN	2,8	0,03	0,02	0,01	<0,2	80,0	1	210	28	62
CN	2,9	0,05	0,04	0,01	<0,2	104,0	1	164	49	69
CP	2,7	0,04	0,03	0,01	<0,2	63,0	1	196	31	70
CP	2,6	0,04	0,03	0,01	<0,2	89,0	1	115	29	68
M	3,2	0,03	0,02	0,01	<0,2	91,0	1	95	18	73
P	2,9	0,03	0,02	0,01	<0,2	94,0	1	88	46	53
P	2,7	0,04	0,02	0,02	<0,2	86,0	<0	159	45	40
TFD	2,8	0,03	0,02	0,01	<0,2	71,0	1	304	35	72
TFD	2,6	0,03	0,02	0,01	<0,2	92,0	1	62	24	58
MP	2,5	0,02	0,01	0,01	<0,2	81,0	<0	112	63	66
PTFD	2,7	0,03	0,02	0,01	<0,2	89,0	1	142	66	66
PTFD	2,8	0,04	0,03	0,01	<0,2	96,0	1	72	28	37
MTFD	3,0	0,20	0,14	0,06	<0,2	118,0	1	340	79	50



## 4.2.6 Critérios Imunológicos

### 4.2.6.1 Expressão de Corpúsculos Lipídicos Detectada pela Coloração com *Oil Red O*.

A Tabela 18, Tabela 19, Tabela 20, e Tabela 21 apresentam os resultados encontrados após a quantificação do número de células nas lâminas de cada animal. A quantificação permitiu avaliar o número de células que produziram ou não corpúsculos lipídicos, e o número total destes, com isso, foi possível obter o índice corpuscular, a proporção e a média das células contadas. A Tabela 18 e a Tabela 20 apresentam os valores encontrados nas amostras que foram estimuladas com LPS nas etapas D7 e D13, respectivamente. A Tabela 19 e a Tabela 21, representam os resultados das amostras que não foram estimuladas com LPS nas etapas D7 e D13, respectivamente.

Tabela 18 - Resultados da quantificação dos corpúsculos lipídicos sensibilizados com LPS no D7 demonstrando o índice corpuscular, a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma e a média de corpúsculos dentro dos macrófagos.

	Total de Células	Células que não produzem corpúsculos	Células que produzem corpúsculos	Nº de corpúsculos	IC	MØ%	Média
CN - I	200	126	74	126	63,0	37,0	1,7
CN - IV	200	140	60	140	70,0	30,0	2,3
CP - I	200	128	72	128	64,0	36,0	1,8
CP - IV							
M - I	200	168	32	168	84,0	16,0	5,3
M - IV	200	184	16	184	92,0	8,0	11,5
P - I	200	44	156	44	22,0	78,0	0,3
P - IV	200	120	80	120	60,0	40,0	1,5
TFD - I	200	82	118	82	41,0	59,0	0,7
TFD - IV	200	54	146	54	27,0	73,0	0,4
MP - I	200	166	34	166	83,0	17,0	4,9
MP - IV	200	162	38	162	81,0	19,0	4,3
PTFD - I	200	148	52	148	74,0	26,0	2,8
PTFD - IV	200	161	39	161	80,5	19,5	4,1
MTFD - II	200	166	34	166	83,0	17,0	4,9
MTFD - VI	200	164	36	164	82,0	18,0	4,6
MPTFD - I	200	175	25	175	87,5	12,5	7,0
MPTFD - VI	200	187	13	187	93,5	6,5	14,4

IC (índice corpuscular):  $100 \times \text{n}^\circ \text{ de corpúsculos} / \text{n}^\circ \text{ total de células}$ .

MØ%:  $100 \times \text{n}^\circ \text{ de células que produziram corpúsculos} / \text{n}^\circ \text{ total de células}$ .

Média: índice corpuscular / proporção.

Tabela 19 - Resultados da quantificação dos corpúsculos lipídicos no D7 demonstrando o índice corpuscular, a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma e a média de corpúsculos dentro dos macrófagos.

	Total de Células	Células que não produzem corpúsculos	Células que produzem corpúsculos	Nº de corpúsculos	IC	MØ%	Média
CN - I	200	125	75	125	62,5	37,5	1,7
CN - IV	200	139	61	139	69,5	30,5	2,3
CP - I	200	145	55	145	72,5	27,5	2,6
CP - IV							
M - I	200	166	34	166	83,0	17,0	4,9
M - IV	200	180	20	180	90,0	10,0	9,0
P - I	200	64	136	64	32,0	68,0	0,5
P - IV	200	75	125	75	37,5	62,5	0,6
TFD - I	200	87	113	87	43,5	56,5	0,8
TFD - IV	200	133	67	133	66,5	33,5	2,0
MP - I	200	169	31	169	84,5	15,5	5,5
MP - IV	200	175	25	175	87,5	12,5	7,0
PTFD - I	200	137	63	137	68,5	31,5	2,2
PTFD - IV	200	140	60	140	70,0	30,0	2,3
MTFD - II	200	164	36	164	82,0	18,0	4,6
MTFD - VI	200	162	38	162	81,0	19,0	4,3
MPTFD - I	200	169	31	169	84,5	15,5	5,5
MPTFD - VI	200	189	11	189	94,5	5,5	17,2

IC (índice corpuscular):  $100 \times \text{n}^\circ \text{ de corpúsculos} / \text{n}^\circ \text{ total de células}$ .

MØ%:  $100 \times \text{n}^\circ \text{ de células que produziram corpúsculos} / \text{n}^\circ \text{ total de células}$ .

Média: índice corpuscular / proporção.

Tabela 20 - Resultados da quantificação dos corpúsculos lipídicos sensibilizados com LPS no D13 demonstrando o índice corpuscular, a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma e a média de corpúsculos dentro dos macrófagos.

	Total de Células	Células que não produzem corpúsculos	Células que produzem corpúsculos	Nº de corpúsculos	IC	MØ%:	Média
CN - II	200	139	61	139	69,5	30,5	2,3
CN - V	200	148	52	148	74,0	26,0	2,8
CP - II	200	142	58	142	71,0	29,0	2,4
CP - V	206	138	68	138	67,0	33,0	2,0
M - III	200	141	59	141	70,5	29,5	2,4
P - II	200	145	55	145	72,5	27,5	2,6
P - V	200	136	64	136	68,0	32,0	2,1
TFD - III	200	159	41	159	79,5	20,5	3,9
TFD - VI	200	157	43	157	78,5	21,5	3,7
MP - III	200	176	24	176	88,0	12,0	7,3
PTFD - II	200	92	108	92	46,0	54,0	0,9
PTFD - V	200	55	145	55	27,5	72,5	0,4
MTFD - III	200	170	30	170	85,0	15,0	5,7

IC (índice corpuscular):  $100 \times \text{n}^\circ \text{ de corpúsculos} / \text{n}^\circ \text{ total de células}$ .

MØ%:  $100 \times \text{n}^\circ \text{ de células que produziram corpúsculos} / \text{n}^\circ \text{ total de células}$ .

Média: índice corpuscular / proporção.

Tabela 21 - Resultados da quantificação dos corpúsculos lipídicos no D13 demonstrando o índice corpuscular, a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma e a média de corpúsculos dentro dos macrófagos.

	Total de Células	Células que não produzem corpúsculos	Células que produzem corpúsculos	Nº de corpúsculos	IC	MØ%:	Média
CN - II	200	149	51	149	74,5	25,5	2,9
CN - V	200	138	62	138	69,0	31,0	2,2
CP - II	200	152	48	152	76,0	24,0	3,2
CP - V	200	145	55	145	72,5	27,5	2,6
M - III	200	147	53	147	73,5	26,5	2,8
P - II	200	100	100	100	50,0	50,0	1,0
P - V	200	139	61	139	69,5	30,5	2,3
TFD - III	200	154	46	154	77,0	23,0	3,3
TFD - VI	200	169	31	169	84,5	15,5	5,5
MP - III	200	185	15	185	92,5	7,5	12,3
PTFD - II	200	68	132	68	34,0	66,0	0,5
PTFD - V	200	63	137	63	31,5	68,5	0,5
MTFD - III	200	164	36	164	82,0	18,0	4,5

IC (índice corpuscular):  $100 \times \text{n}^\circ \text{ de corpúsculos} / \text{n}^\circ \text{ total de células}$ .

MØ%:  $100 \times \text{n}^\circ \text{ de células que produziram corpúsculos} / \text{n}^\circ \text{ total de células}$ .

Média: índice corpuscular / proporção.

A avaliação do efeito da miltefosina, pentoxifilina e terapia fotodinâmica (TFD) na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, no dia 7 de tratamento, foi baseada na análise do percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos (%), na média de expressão corpuscular, e no índice corpuscular, conforme apresentado na Figura 18.

Seguindo os mesmos critérios apresentados anteriormente, a avaliação do efeito das associações miltefosina+pentoxifilina (MP), pentoxifilina+TFD (PTFD), miltefosina+TFD (MTFD), e miltefosina+pentoxifilina+TFD (MPTFD), no dia 7 de tratamento, também foi baseada na análise do percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos (%), na média de expressão corpuscular, e no índice corpuscular, conforme apresentado na Figura 19.

De acordo com os testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn, adotados nestas análises, constatou-se normalidade entre os resultados encontrados, tanto no percentual de macrófagos peritoneais expressando corpúsculos lipídicos, quanto nos

resultados encontrados na média de expressão corpuscular e índice corpuscular. Essa normalidade estatística foi encontrada na avaliação do tratamento com as drogas de maneira isolada e quando associadas, no D7.

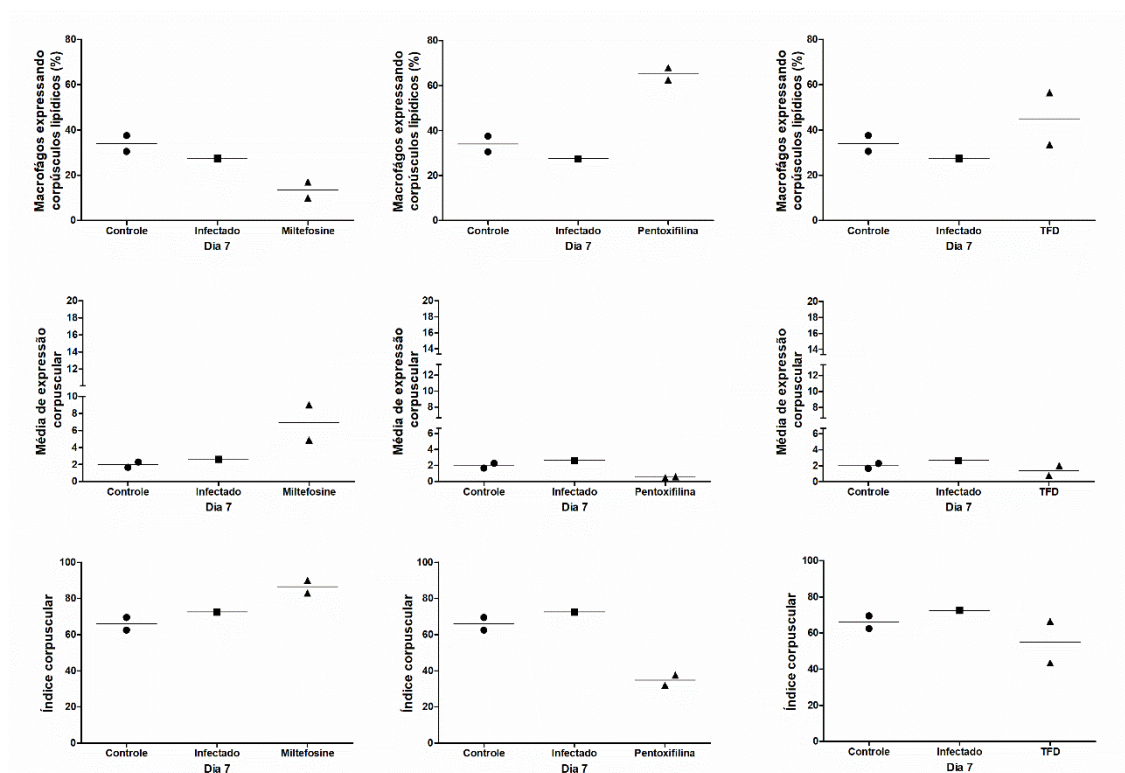


Figura 18 - Avaliação do efeito da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*. Percentual de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos, média corpuscular e índice corpuscular. Dia 7- Miltefosina; Dia 7 - Pentoxifilina; Dia 7 - TFD. Nenhum valor de p foi menor 0,05 (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

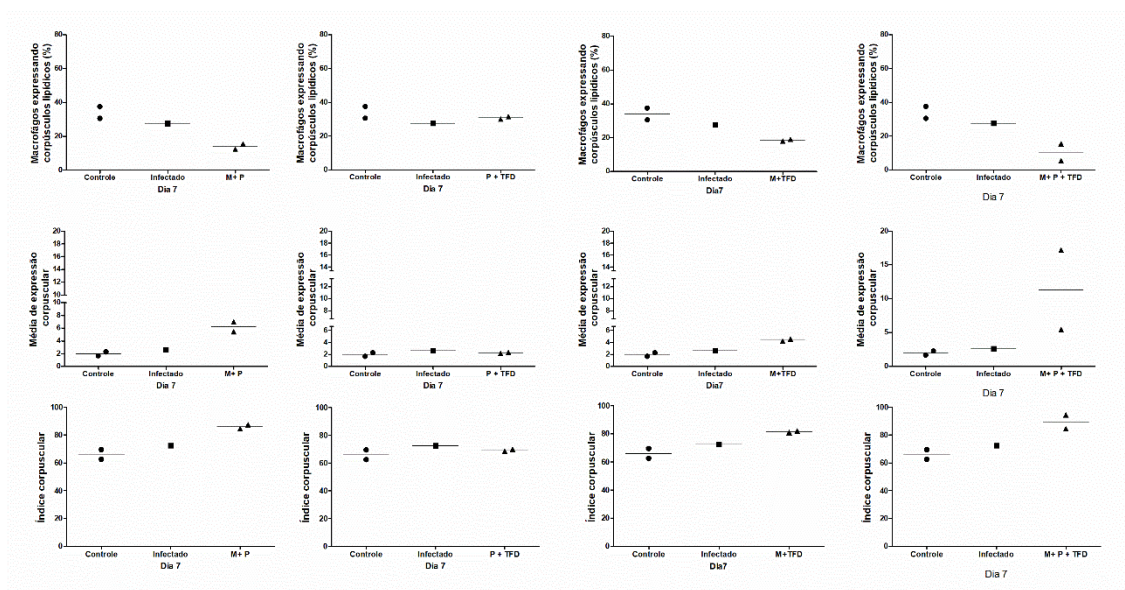


Figura 19 - Avaliação do efeito da associação da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*. Dia 7- Miltefosina + Pentoxifilina; Dia 7 - Pentoxifilina + TFD; Dia 7 - Miltefosina +TFD; Dia 7- Miltefosina + Pentoxifilina + TFD. Nenhum valor de p foi menor 0,05, (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn;). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

O percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos (%), a média de expressão corpuscular, e o índice corpuscular, foram descritos de acordo com os resultados obtidos da avaliação do efeito da miltefosina, pentoxifilina, TFD, e associações destas drogas, na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, no dia 13 de tratamento, conforme demonstrado na Figura 20 e Figura 21.

A avaliação por meio dos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn, demonstra normalidade entre os resultados encontrados no percentual de macrófagos peritoneais expressando corpúsculos lipídicos, nos resultados da média de expressão corpuscular e no índice corpuscular. Essa normalidade estatística foi encontrada na avaliação do tratamento com as drogas administradas isoladamente e em associação, no D13.

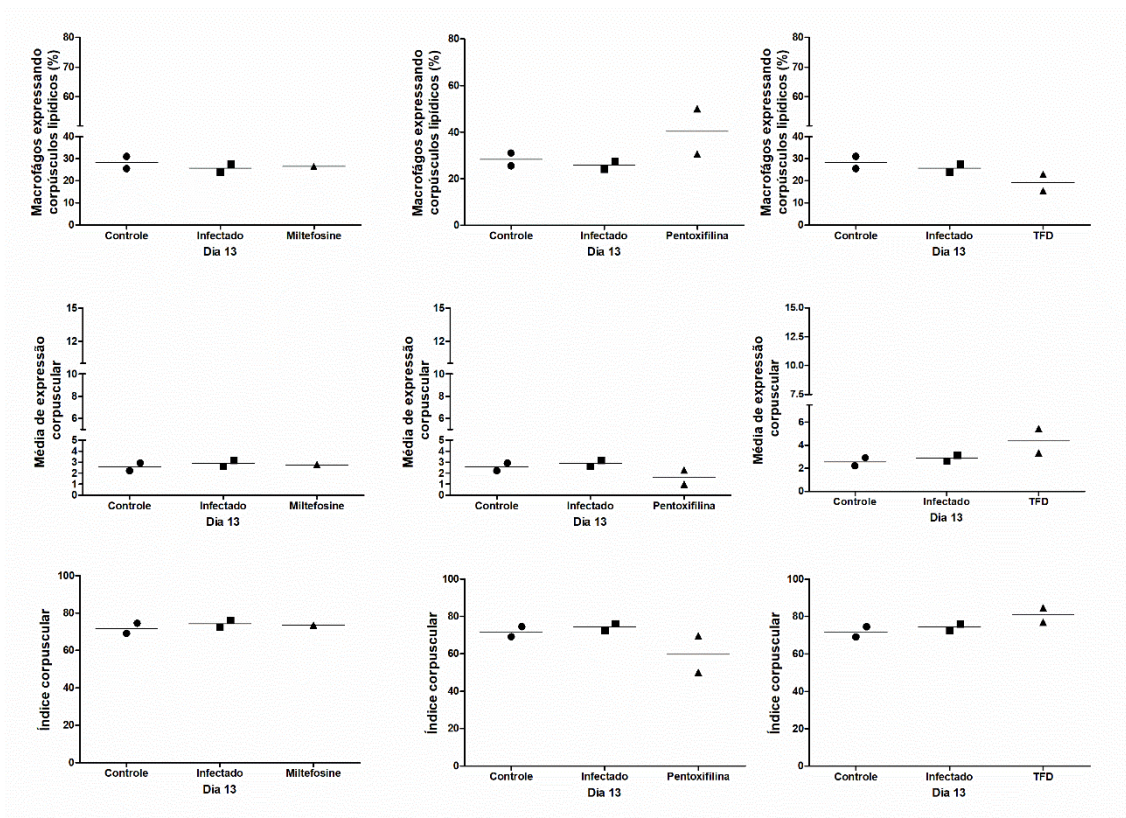


Figura 20 - Avaliação do efeito da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*. Percentual de macrófagos apresentando lipídicos, média corpuscular e índice corpuscular. Dia 7 - Miltefosina; Dia 7 - Pentoxifilina; Dia 7 - TFD. Nenhum valor de p foi menor 0,05 (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.



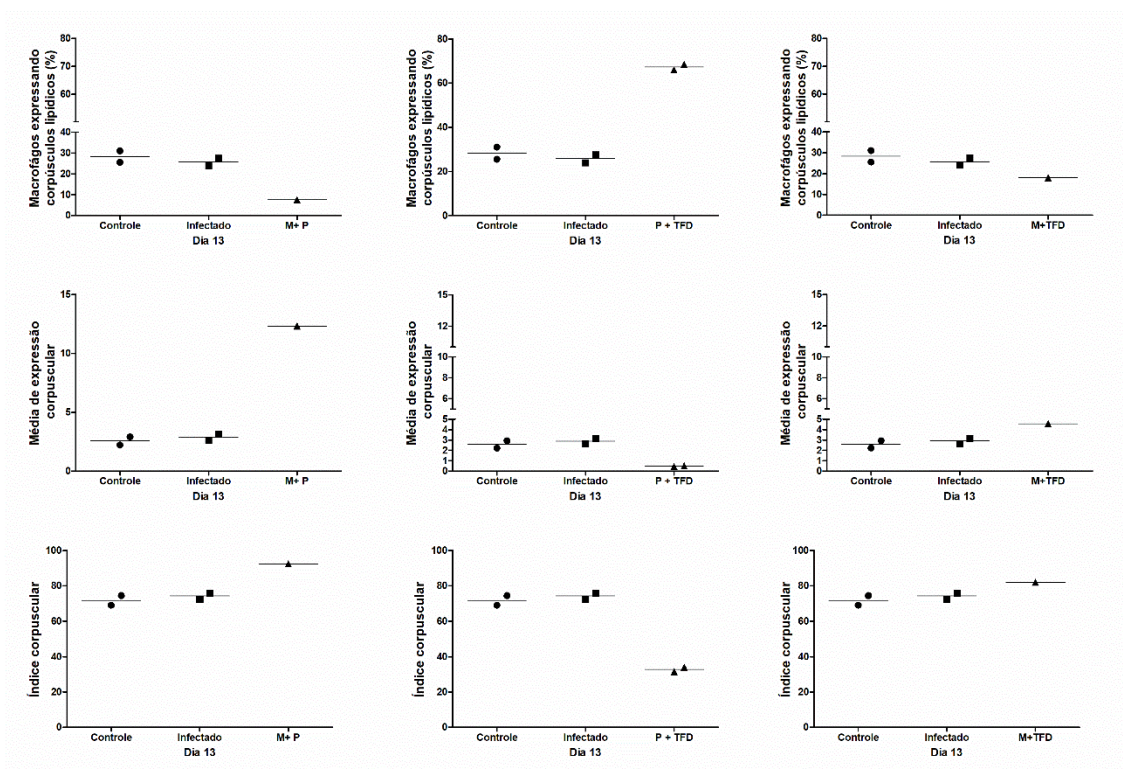


Figura 21 - Avaliação do efeito da associação da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*. Dia 13 - Miltefosina + Pentoxifilina; Dia 13 - Pentoxifilina + TFD; Dia 13 - Miltefosina +TFD. Nenhum valor de p foi menor 0,05 (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn;). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

#### 4.2.6.2 Determinação da Produção de Óxido Nítrico

As avaliações do efeito da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, no D7 e D13, apresentaram-se em diferentes concentrações ( $\mu\text{M}$ ), conforme apresentado na Figura 22.

É importante ressaltar que na avaliação D7, o grupo controle negativo (CN) apresentou visualmente diferenças entre os animais, no que se refere à produção de óxido nítrico. Um camundongo apresentou produção de aproximadamente  $200\mu\text{M}$  de óxido nítrico, e o outro animal, apresentou aproximadamente  $900\mu\text{M}$  da mesma molécula.

Na avaliação da produção de óxido nítrico nos animais tratados no D7 com as drogas miltefosina ( $p = 0,5647$ ), pentoxifilina ( $p = 0,3679$ ) e TFD ( $p = 0,5647$ ), o valor de p encontrado para ambas foi maior que 0,05, indicando que não houve diferença

entre os grupos, e sim, normalidade nas amostras comparadas. No dia 13 de tratamento, a quantificação da produção de óxido nítrico nos animais tratados com miltefosina ( $p = 0,1653$ ), pentoxifilina ( $p = 0,5647$ ), e TFD ( $p = 0,1017$ ) também indicou não haver diferença entre os grupos. A estatística empregada nestas avaliações utilizou o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

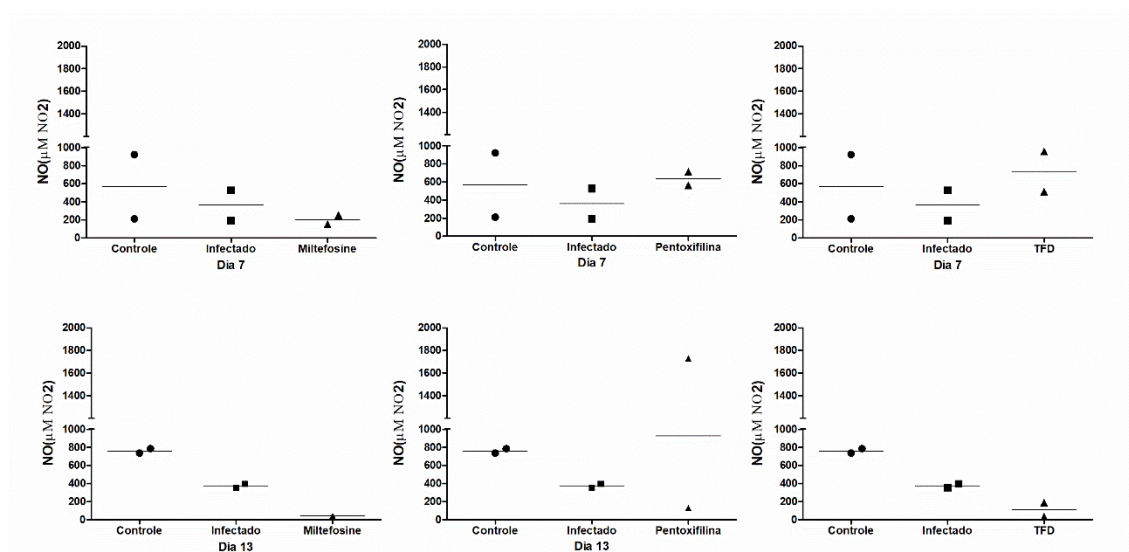


Figura 22 - Avaliação do efeito da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, concentração expressa em  $\mu\text{M}$ . Dia 7- Miltefosina,  $p = 0,5647$ ; Dia 7 - Pentoxifilina,  $p = 0,3679$ ; Dia 7 - TFD,  $p = 0,5647$ , Dia 13 - Miltefosina,  $p = 0,1653$ ; Dia 13 - Pentoxifilina,  $p = 0,5647$ ; Dia 13 - TFD,  $p = 0,1017$ , (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

As avaliações dos efeitos das associações das drogas miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, no dia 7 de tratamento, apresentaram-se em diferentes concentrações ( $\mu\text{M}$ ), conforme apresentado na Figura 23.

Na avaliação da produção de óxido nítrico nos animais tratados no D7 com as associações das drogas miltefosina + pentoxifilina ( $p = 0,7528^2$ ), pentoxifilina + TFD ( $p = 0,6514^1$ ), miltefosina +TFD ( $p = 0,8220^2$ ) e miltefosina + Pentoxifilina + TFD ( $p = 0,6864^2$ ), o valor de  $p$  encontrado para ambas foi maior que 0,05, indicando que não houve diferença entre os grupos, e sim, normalidade nas amostras comparadas. A análise estatística empregada nestas avaliações utilizou o teste Kruskal-Wallis<sup>1</sup>,

seguido pelo método de Dunn, e ANOVA<sup>2</sup>, seguido pelo método de Tukey. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

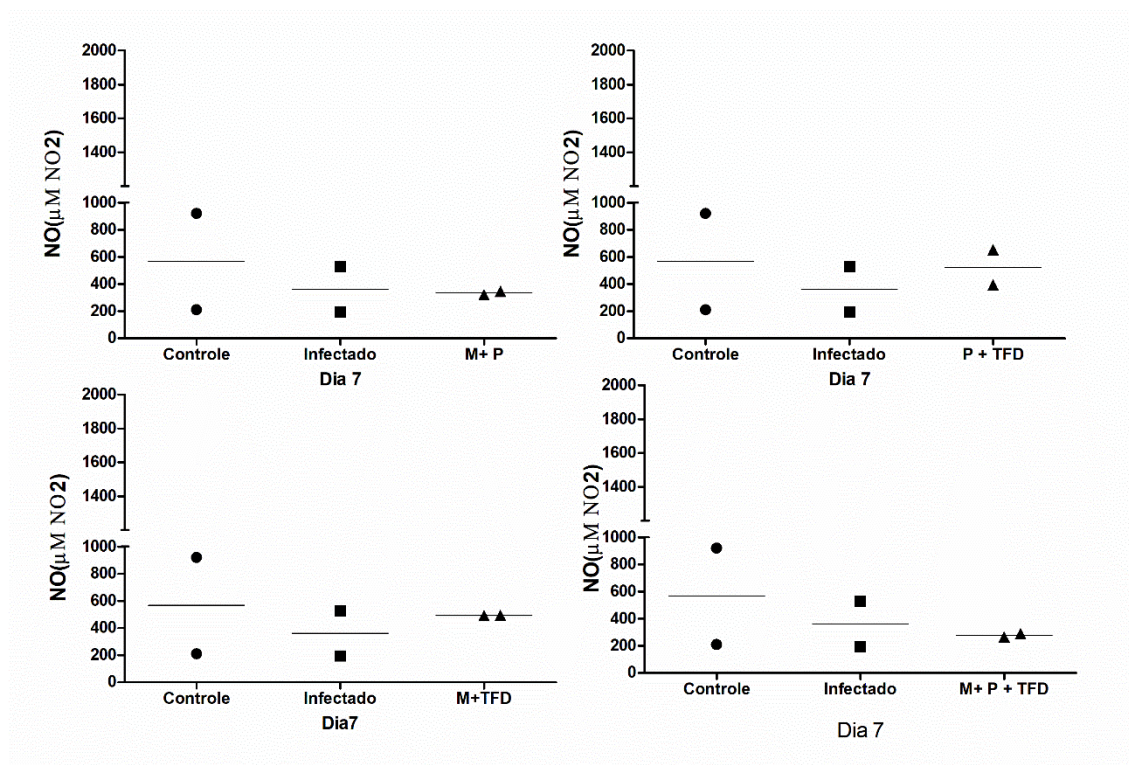


Figura 23 - Avaliação do efeito da associação da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, concentração expressa em µM. Dia 7 - Miltefosina + Pentoxifilina,  $p = 0,7528^2$ ; Dia 7 – Pentoxifilina + TFD,  $p = 0,6514^1$ ; Dia 7 – Miltefosina +TFD,  $p = 0,8220^2$ , Dia 7- Miltefosina + Pentoxifilina + TFD,  $p = 0,6864^2$  (1teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; <sup>2</sup>ANOVA, seguido pelo método de Tukey). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

As avaliações dos efeitos das associações das drogas miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, no dia 13 de tratamento, apresentaram-se em diferentes concentrações (µM), conforme apresentado na Figura 24.

Na avaliação da produção de óxido nítrico nos animais tratados no D13 com as associações das drogas miltefosina + pentoxifilina ( $p = 0,1653^1$ ) e miltefosina +TFD ( $p = 0,1653^1$ ), o valor de  $p$  encontrado para ambas foi maior que 0,05, indicando que não houve relevância significativa. No grupo de animais tratados com a associação da pentoxifilina + TFD, a análise estatística da avaliação da produção de óxido nítrico apresentou relevância significativa, com  $p = 0,0245^2$ . A análise estatística empregada

nestas avaliações utilizou o teste Kruskal-Wallis<sup>1</sup>, seguido pelo método de Dunn, e ANOVA<sup>2</sup>, seguido pelo método de Tukey. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

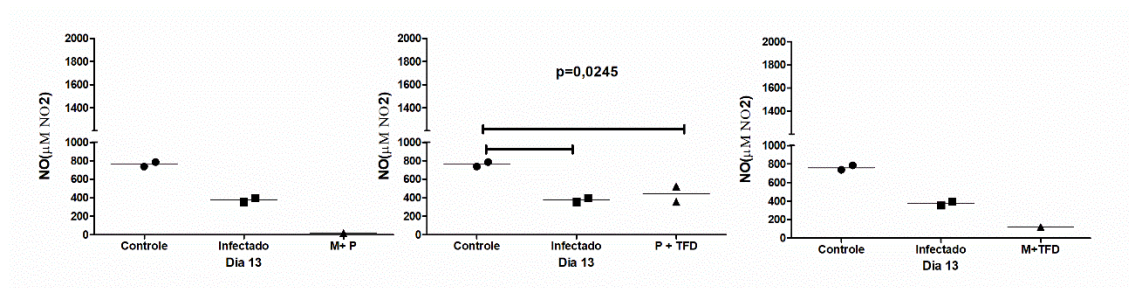


Figura 24 - Avaliação do efeito da associação da miltefosina, pentoxifilina e TFD na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania braziliensis*, concentração expressa em  $\mu\text{M}$ . Dia 13 - Miltefosina + Pentoxifilina,  $p = 0,1653^1$ ; Dia 13 - Pentoxifilina + TFD,  $p = 0,0245^2$ ; Dia 13 - Miltefosina + TFD,  $p = 0,1653^1$  (<sup>1</sup>teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; <sup>2</sup>ANOVA, seguido pelo método de Tukey). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

## 5. DISCUSSÃO

Na confirmação da infecção aos 45 dias após inoculação dos animais, todos os aspirados dos grupos, exceto o CN, tiveram crescimento de leishmânias, mesmo padrão encontrado em outro estudo que avaliou a eficácia da miltefosina associado com TFD com fitalocianina de cloro-alumínio lipossomal no tratamento de LC causada por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6 (30). Os meios de cultura realizados no D7, também apresentaram crescimento de parasitos, exceto o CN. Nesta fase de avaliação, as culturas que apresentaram crescimento de leishmânias tardiamente (120h) foram as dos grupos tratados com M, MP, MTFD e MPTFD, ou seja, todos os grupos que receberam a droga miltefosina, sugerindo que a droga pode influenciar o crescimento destes parasitos em meio de cultura. No último período de avaliação, D13, os grupos M, MP não apresentaram crescimento de parasitos nos meios de cultura, resultados diferentes dos encontrados em outro estudo com camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis*, no qual o primeiro grupo apresentou uma cultura positiva, e o segundo apresentou duas culturas positivas (18).

Em estudo realizado comparando a eficácia do tratamento de miltefosina e miltefosina com pentoxifilina em camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis*, após 12 dias de administração das drogas, foi possível observar formas amastigotas do parasito apenas nos esfregaços do grupo CP, corroborando com os resultados observados nos mesmos grupos e período de tratamento deste estudo (18). Na pesquisa que avaliou a eficácia do miltefosina e miltefosina associado com TFD e fitalocianina de cloro-alumínio lipossomal em camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis*, não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação à pesquisa de amastigota (30). A observação visual das lâminas contendo os esfregaços para pesquisa de formas amastigotas pode ser considerada imprecisa devido à baixa sensibilidade do teste devido ou erro do observador, ao tipo de material biológico e a dificuldade em fixar e corar os parasitos nas lâminas, e ainda, o grau de parasitismo (18,30,85), por isso, deve ser associada a outros critérios para avaliação do tratamento.

Após o período de observação das placas utilizadas para a análise da diluição seriada, na primeira etapa de avaliação do tratamento (D7) e na segunda etapa (D13), as placas referentes ao CN, não apresentaram crescimento de parasitos como

esperado, indicando a não infecção dos animais deste grupo. O resultado oposto ocorreu com as placas do grupo CP, que apresentou crescimento de leishmânias nas duas etapas de avaliação, indicando a infecção dos animais. Na fase D7, as placas dos grupos CN e CP não apresentaram crescimento de fungos, o que ocorreu na fase D13 com ambos os grupos.

As placas referentes ao grupo M, apresentaram resultados satisfatórios, visto que após seis dias de tratamento poucos poços positivaram para o crescimento de parasitos, e após 12 dias de tratamento nenhum poço da placa positivou.

Nas placas com as amostras do grupo tratado com pentoxifilina, os resultados não foram animadores, pois no D7 todos os poços positivaram para o crescimento de parasitos, e no D13, apenas alguns poços da última diluição e um poço da penúltima diluição não apresentaram crescimento de leishmânias, demonstrando aparentemente que a droga não foi eficaz durante os 12 dias de administração. O mesmo padrão foi observado nas placas do grupo tratado com a TFD, porém, com piores resultados no D13, onde todos os poços permaneceram positivos para o crescimento de leishmânias. Esses dados foram confirmados pela análise do MTT que demonstra semelhança destes grupos de tratamento com o grupo controle positivo.

Os resultados observados visualmente nas placas do grupo MP, mostraram que no D7 a maioria dos poços apresentaram crescimento de leishmânias, sugerindo que a pentoxifilina que é uma metilxantina que suprime a transcrição do gene TNF- $\alpha$ , assim como alguns imunobiológicos (27), pode influenciar no crescimento destes parasitos, alterando a ação da miltefosina, visto que o grupo tratado apenas com miltefosina apresentou melhores resultados no tratamento durante o mesmo período.

No estudo que descreveu um caso de LC, sem manifestação visceral, causada por *Leishmania (Leishmania) infantum*, o paciente apresentou granulomas na pele enquanto fazia uso de anti-TNF alfa e metotrexato, indicando que a terapia biológica pode ter sido o principal fator desencadeante da doença, visto que está associada ao aumento do risco de infecções. Neste caso, o paciente estava portando uma infecção inaparente por *Leishmania (Leishmania) infantum* e provavelmente o anti-TNF alfa foi o gatilho para a manifestação clínica da doença (86).

Ao avaliar o tratamento no D13, visualmente nas placas de diluição limitante, o grupo MP apresentou o mesmo resultado que o grupo tratado com miltefosina isoladamente, não apresentando crescimento de leishmânias em nenhum poço da

placa, podendo indicar que neste caso, com mais tempo de tratamento, a pentoxifilina não influenciou negativamente na ação da miltefosina. Complementarmente, a análise pelo MTT demonstrou que há diferença significativa na comparação entre MP e M.

Neste estudo, a análise estatística mostrou que o tratamento com a associação MP, apresentou resultados semelhantes ao controle negativo, o que não ocorreu ao comparar a miltefosina isoladamente com o mesmo grupo controle. Em outro estudo experimental que avaliou a eficácia da miltefosina-pentoxifilina comparada à miltefosina no tratamento da LC em camundongos C57Bl/6, verificou-se que o tratamento MP também foi mais eficaz que miltefosina isolada, quando ambos foram comparados ao grupo controle, corroborando com os resultados deste trabalho (18). Um ensaio clínico randomizado que utilizou a miltefosina oral associada à pentoxifilina para o tratamento de LTA apresentou boa taxa de cura, ressaltando baixos índices de efeitos adversos (24).

No grupo PTFD, a placa referente ao D7 apresentou crescimento de parasitos em pouco mais da metade do total de poços, resultados melhores quando comparados aos observados na placa do grupo tratado apenas com pentoxifilina, na qual todos os poços foram positivos para o crescimento de parasitos, o que poderia sugerir que a associação com a TFD ajudou na eficácia do tratamento neste período. Contudo, os dados obtidos pelo MTT demonstram haver semelhança entre os grupos de tratamento.

Esta associação PTFD, após doze dias de tratamento (D13), apresentou positividade para crescimento de leishmânias em todos os poços, o que não ocorreu no grupo tratado apenas com pentoxifilina, no qual poucos poços não apresentaram crescimento de parasitos. O mesmo resultado foi obtido pela análise do MTT, que demonstra haver diferença significativa entre os grupos. Os resultados sugerem que a pentoxifilina associada à terapia fotodinâmica parece ser mais eficaz no tratamento durante doze dias de tratamento.

Na placa referente ao grupo MTFD, no D7 mais da metade dos poços não apresentaram crescimento de parasitos, porém, aparentemente, esse resultado não foi melhor que o observado no grupo tratado apenas com miltefosina, no qual a maior parte da placa não apresentou crescimento de leishmânias. De acordo com a análise do MTT, essa comparação demonstra que os grupos de tratamento tiveram resultados semelhantes. Entretanto, no D13 na associação MTFD nenhum poço apresentou crescimento de leishmânias, mesmo resultado observado no grupo tratado com

miltefosina isolado. A estatística pelo MTT corrobora com esses resultados, visto após doze dias de tratamento, a associação MTFD assemelhou-se ao grupo controle negativo.

No grupo tratado com associação MPTFD, a maioria dos poços da placa referente ao D7 não apresentou crescimento de parasitos, e os resultados quase foram iguais aos observados na placa do grupo tratado apenas com miltefosina. Pela análise do MTT, há diferença significativa entre os grupos. Não foi possível comparar os resultados com os do D13 porque os animais não resistiram até o final do estudo, o que poderá ser avaliado após a análise estatística dos dados e a comparação entre diferentes metodologias para identificar os possíveis efeitos colaterais sofridos pelos animais que foram submetidos a esta terapia.

De acordo com os resultados obtidos na avaliação da qPCR, é possível inferir que no grupo CP a diminuição do número de parasitos visualizada no D13 e quando comparada ao D7, pode indicar ação dos mecanismos de defesa do próprio organismo do camundongo.

No grupo tratado com miltefosina não houve detecção de parasitos nas duas etapas de avaliação do tratamento, porém, deve-se levar em consideração o limite mínimo de detecção da curva padrão, o que impossibilita afirmar que não havia parasitos, apenas que a quantidade encontrada provavelmente foi menor que 12,02 leishmânias.

O grupo tratado com a pentoxifilina apresentou um número muito elevado de leishmânias na primeira etapa de avaliação do tratamento, porém, a redução do número de parasitos observada na segunda etapa foi relevante ao considerar mais seis dias de administração da droga. Ressalta-se que mesmo diante do número excessivo de parasitos nos camundongos do grupo tratado com esta droga, os animais não apresentaram sinais e sintomas clínicos importantes que caracterizassem um quadro mais grave relacionado à infecção.

Aparentemente, a terapêutica do grupo tratado apenas com a TFD não foi eficaz, visto que na segunda etapa de avaliação houve um aumento do número de parasitos quando comparado à primeira etapa.

O grupo MP apresentou bons resultados na primeira etapa de avaliação do tratamento, e ainda melhores na segunda etapa, quando não houve detecção de parasitos. Levando em consideração os resultados do grupo tratado apenas com a



pentoxifilina, parece que quando associada ao miltefosina, o efeito potencializador do aumento do número de parasitos não ocorre.

No grupo PTFD foi possível constatar um aumento considerável do número de parasitos na segunda etapa de avaliação do tratamento, o que pode ser sugerido pela associação com a pentoxifilina, visto que no grupo tratado apenas com essa droga, o número de leishmânias foi muito elevado na primeira etapa de tratamento.

O grupo MTFD também apresentou um número reduzido de parasitos na primeira etapa de avaliação do tratamento, e na segunda etapa, de acordo com o limite mínimo de detecção, não foram detectadas leishmânias. Ao comparar esse tratamento com o grupo que recebeu apenas miltefosina, é possível inferir que a TFD associada a este medicamento, parece de alguma maneira influenciar negativamente o tratamento, já que na primeira etapa houve detecção de parasitos, o que não foi observado no grupo M.

No grupo MPTFD, constatou-se que no D7 do tratamento a quantidade de parasitos detectadas foi a mesma encontrada no grupo MTFD, o que pode indicar neste caso, que a pentoxifilina quando associada às outras drogas parece não potencializar o aumento do número de parasitos, o que já havia sido constatado quando associada apenas ao miltefosina. Neste caso, foi possível constatar que a miltefosina parece ter minimizado os efeitos da pentoxifilina e da TFD, que juntas não apresentaram bons resultados. A associação MPTFD parece ser mais eficaz que a associação MP no D7 de tratamento, visto que na comparação dos grupos apresentou um número reduzido de leishmânias.

Ao comparar os resultados dos exames bioquímicos nos dois períodos analisados, percebe-se que na maioria deles não foram detectadas alterações consideráveis, porém, os valores da fosfatase alcalina, TGO e TGP parecem ter sofrido alterações de uma etapa para a outra. Tais alterações, podem indicar efeitos adversos das drogas utilizadas nos grupos de tratamento, visto que alguns pacientes tratados com miltefosina apresentam hepato e nefrotoxicidade (reversíveis), evidenciadas pela elevação dos níveis séricos dessas enzimas (87,88).

Devido a questões técnicas e operacionais, não foi possível verificar os efeitos adversos dos esquemas terapêuticos em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* por meio de análises bioquímicas e histopatológicas. Os dados obtidos dos exames bioquímicos serão analisados juntamente com os resultados dos exames histopatológicos. O material coletado para histopatologia, conforme descrito na

metodologia, permanece armazenado em condições adequadas para que em momento oportuno seja processado, e os resultados obtidos sejam incluídos em artigo científico a ser publicado.

Ao analisar a ação da **miltefosina** em relação à produção de **óxido nítrico**, parece existir uma tendência de diminuição da produção dessa molécula pela ação da droga, tanto no D7 quanto no D13. Essa avaliação, corrobora com dados que mostraram que, além do efeito antimicrobiano da miltefosina, a droga apresentou efeitos imunomoduladores em macrófagos, neste caso, em camundongos C57BL/6, melhorando a fagocitose e diminuindo a produção de NO (54).

Na análise da **pentoxifilina**, foi possível observar que há uma tendência de aumento na produção de **óxido nítrico**, nos dois períodos de tratamento, D7 e D13. Em relação à **TFD**, parece existir uma tendência de aumento (discreto) da produção de **óxido nítrico** no D7, e uma diminuição no D13.

Na associação **MP**, a produção de **óxido nítrico** no D7 foi semelhante ao grupo infectado (controle positivo), e no D13 apresentou possível tendência de diminuição da produção desta molécula.

Ao analisar a associação **PTFD**, no D7 a produção de **óxido nítrico** foi semelhante à produção pelos grupos controles, e no D13, esse tratamento apresentou relevância significativa, demonstrando que foi constatada diferença entre os grupos de comparação (controles negativo e positivo), com valor de  $p = 0,0245$ .

Na avaliação da associação **MTFD**, no D7 a produção de **óxido nítrico** foi semelhante aos grupos controles, e no D13, apresentou uma tendência de diminuição na produção de NO.

O grupo da associação **MPTFD**, no D7, apresentou produção de **óxido nítrico** semelhante aos grupos controles, e no D13, não foi possível realizar a análise devido a perda de animais durante o curso dos experimentos.

Na avaliação do efeito das drogas de maneira isolada, no que se refere ao percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos (D7), é possível observar que a miltefosina apresentou tendência em diminuir a produção de corpúsculo lipídico pelos macrófagos, e o inverso aconteceu com a pentoxifilina, que aparentemente apresentou tendência de aumento na produção dos corpúsculos. No grupo tratado com a TFD é possível observar uma tendência de aumento de produção de corpúsculos lipídicos menos expressiva ao comparar com o grupo tratado com a pentoxifilina.

Em relação à média de expressão corpuscular (D7), é possível observar que a miltefosina apresentou tendência de aumento em relação ao grupo infectado, e a pentoxifilina e a TFD apresentaram tendência de diminuição.

No que se refere ao índice corpuscular (D7), é possível observar que a miltefosina apresenta uma tendência de aumento (muito pequena) em relação ao grupo infectado; a pentoxifilina apresenta uma tendência aparentemente maior de diminuição em relação ao infectado; e a TFD apresenta uma tendência discreta de diminuição em relação ao infectado. Contudo, analisando o percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos, a média de expressão corpuscular, e o índice corpuscular, é possível observar que aparentemente a pentoxifilina e a TFD possuem uma ação parecida.

Na avaliação do efeito da associação das drogas, no D7, referente ao percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos, à média de expressão corpuscular, e ao índice corpuscular, houve uma falha no grupo de animais infectados (CP) e que serve como grupo de comparação, visto que um animal não apresentou células suficientes para realizar a contagem, o que diminui o número de animais disponíveis para análise.

Em relação ao efeito das drogas referente ao percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos (D7), na associação MP é possível observar uma tendência de diminuição; na associação PTFD não foi possível observar diferença, pois o grupo apresenta resultados semelhantes aos grupos controles; na associação MTFD é possível observar uma discreta tendência de diminuição; e na associação MPTFD aparentemente há uma tendência de diminuição em relação ao percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos.

Nos resultados da média de expressão corpuscular (D7), a associação MP apresentou aparentemente uma tendência de aumento; na associação PTFD o grupo apresentou resultados semelhantes aos grupos controles; na associação MTFD é possível observar uma discreta tendência de aumento; e a associação MPTFD parece apresentar uma tendência de aumento.

Na avaliação referente ao efeito da associação das drogas, em relação ao índice corpuscular (D7), as associações MP e MPTFD apresentaram aparentemente uma tendência de aumento; a associação PTFD apresentou resultados semelhantes aos grupos controles; e a associação MTFD parece apresentar uma discreta tendência de aumento.

Em relação à avaliação do efeito da miltefosina de maneira isolada, no D13, é possível observar que não houve diferença de aumento ou diminuição na produção de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos, na média de expressão corpuscular, e no índice corpuscular.

Ao observar a avaliação do efeito da pentoxifilina isoladamente nas três análises, no D13, é possível verificar que a droga parece aumentar o número de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos; aparentemente apresenta uma discreta tendência de diminuição em relação à média de expressão corpuscular; e uma tendência de diminuição em relação ao índice corpuscular.

A análise do efeito da TFP de maneira isolada, no D13, indica discreta tendência de diminuição em relação aos macrófagos expressando corpúsculos lipídicos; e apresenta discreta tendência de aumento em relação à média de expressão corpuscular e ao índice corpuscular.

Na avaliação do efeito das associações MP e MTFD, no D13, em relação ao percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos, à média de expressão corpuscular, e ao índice corpuscular, um dos animais disponíveis para análise (em cada grupo) não apresentou células suficientes para realizar a contagem, o que diminuiu o número de animais disponíveis para análise. Entretanto, ao observar o efeito da associação MP, parece haver tendência no aumento da média de expressão corpuscular e no índice corpuscular, e o inverso pode ocorrer nos macrófagos expressando corpúsculos lipídicos. Na análise do efeito da associação MTFD, parece existir uma discreta tendência de aumento na média de expressão corpuscular e no índice corpuscular, o e inverso pode ser sugerido nos macrófagos expressando corpúsculos lipídicos.

Ao observar o efeito da associação PTFD, parece que os macrófagos expressando corpúsculos lipídicos apresentam uma possível tendência de aumento em relação aos grupos controles. Em relação à média de expressão corpuscular e índice corpuscular, parece existir uma tendência de diminuição.

É importante ressaltar que todas as observações que indicaram possíveis tendências de aumento ou diminuição, tanto na avaliação da produção de óxido nítrico, quanto na análise da expressão de corpúsculos lipídicos, e que se referem aos grupos tratados com as drogas em teste e suas associações, foram realizadas com base na comparação com os grupos controles. As suposições baseadas nas imagens apresentadas, geradas pela análise estatística, foram inseridas nos achados devido

ao valor de p não ter sido menor que 0,05, e a necessidade de observar as possíveis variações nos grupos de tratamento.

Lamentavelmente, o número de camundongos disponíveis para análise não foi suficiente para obter possível diferença significativa entre os grupos tratados com as diferentes drogas e associações, exceto em uma análise.

Tendo em vista que os corpúsculos lipídicos participam da sinalização intracelular, que a sua expressão pode estar aumentada em células envolvidas no processo inflamatório, e que podem influenciar nos mecanismos de defesa de parasitoses, incluindo a leishmaniose (47,61), os resultados apresentados neste manuscrito podem direcionar futuras pesquisas envolvendo o tratamento experimental da LC em diferentes linhagens de camundongos.

Os resultados expostos neste estudo indicam que pode haver a possibilidade das drogas e suas associações, utilizadas no tratamento experimental da LC em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, influenciarem na produção de óxido nítrico e conseqüentemente na imunopatogenia da doença.

## 6. CONCLUSÃO

A associação MPTFD no tratamento da LC em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis*, apresentou resultados relativamente satisfatórios com seis dias de tratamento, parecendo ser mais eficaz que a associação MP. Entretanto, esta associação precisa ser melhor investigada, pois houve perdas significativas de animais neste grupo, o que impossibilitou a realização de testes após 12 dias tratamento.

A associação PTFD parece ser mais eficaz que o tratamento utilizado apenas com a droga pentoxifilina, e que a TFD pode influenciar nos mecanismos de ação da pentoxifilina impedindo que ocorra o aumento do número de parasitos. Esta associação também parece ser mais eficaz que o grupo tratado apenas com TFD durante seis e doze dias de tratamento.

De acordo com dados da qPCR, a miltefosina ao ser utilizada isoladamente no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, parece ser mais eficaz, inclusive quando comparada aos outros tratamentos. Entretanto, ao analisar os dados pelo método MTT, a associação MP parece ser mais eficaz que M isoladamente.

Ao avaliar a droga pentoxifilina isoladamente nos períodos de tratamento, o medicamento parece não ser eficaz, apresentando resultados semelhantes ao grupo controle positivo. Neste caso, o aumento exacerbado do número de parasitos durante a primeira etapa do tratamento, e mesmo após a redução considerável ao fim do tratamento, pode indicar que a pentoxifilina não tenha colaborado para a cura da doença.

A **terapia fotodinâmica** com hidrogel carregado com C-dots parece ter maior eficácia do que o tratamento com pentoxifilina.

A **qPCR** mostrou ser uma metodologia eficiente para quantificar o número de parasitos por pata de camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* neste estudo experimental. Este teste apresentou o mesmo resultado que o teste de aspirado ao não detectar parasitos após doze dias de tratamento nos grupos miltefosine e MP, indicando boa correlação entre eles.

A associação da pentoxifilina com a terapia fotodinâmica, no que tange à **produção de óxido nítrico**, apresentou relevância significativa e influência imunomoduladora, no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L.*

*braziliensis*, e este resultado pode apoiar futuros estudos utilizando esta opção como possibilidade de tratamento de leishmaniose cutânea de maneira experimental.

A miltefosina administrada isoladamente no tratamento de LC, parece diminuir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, mas precisa ser testada em um número maior de animais para avaliar se há relevância significativa, como demonstrada em outro estudo.

Uma relevante limitação deve ser considerada neste estudo, visto que o número reduzido de animais por grupo em geral, pode ter influenciado estatisticamente nas avaliações dos grupos de tratamento. A indisponibilidade de alguns animais por não se classificarem em determinadas análises pode ter desfavorecido a comparação entre os grupos de tratamento, bem como a presença de *outliers* em grupos controles e grupos de tratamento. Ressalta-se a importância de um número maior de animais para que os testes de tratamentos sejam melhor validados estatisticamente.

Diante do exposto, ressalta-se a importância da testagem e associação de medicamentos e novas metodologias, visto a possibilidade de aumentar as chances de cura na LTA. Para que isso ocorra, sugere-se a realização de trabalhos futuros, principalmente com a possibilidade de utilizar um número maior de animais para que as terapias aqui apresentadas possam ser analisadas mais detalhadamente.

Ademais, é preciso comparar as técnicas de avaliação de eficácia, principalmente no que tange à sensibilidade do método MTT em relação à qPCR, a fim de reavaliar se o número reduzido de animais pode ter influenciado em diferentes resultados. Tal comparação é justificada com base nos resultados do tratamento com a associação PTFD, na qual os dados obtidos da qPCR e da avaliação pelo óxido nítrico apresentaram resultados semelhantes entre si, e diferentes dos observados pela técnica do MTT.

Como perspectivas, objetiva-se testar a TFD utilizando a luz solar, visto que em determinado período do dia, apresenta comprimento de onda semelhante à da luz azul utilizada neste estudo. A proposta tem a premissa da possibilidade de aumentar a adesão ao tratamento baseado na facilidade do uso e do baixo custo, neste caso, uso tópico e ação do tratamento ativada pela luz solar.

A realização de trabalhos experimentais que possam relativizar a quantidade de DNA de leishmânias em relação à quantidade de DNA do animal infectado ou não,

podem auxiliar nos estudos a respeito das opções de tratamento na leishmaniose cutânea.



## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2010;(949):22–6.
2. Saúde OP-A da. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas, dezembro 2020. Inf Leishmanioses;9 [Internet]. 2020 Dec 3 [cited 2022 Feb 3];
3. Brasil. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV [Internet]. Vol. 55, Ministério da Saúde. 2015. 106 p.
4. Portella TP, Kraenkel RA. Spatial–temporal pattern of cutaneous leishmaniasis in Brazil. Infect Dis Poverty [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Feb 3];10(1).
5. Ruiz-Postigo JA, Jain S, Maia-Elkhoury AMAN, Valadas S, Warusavithana S, Osman M, et al. Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap/Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une periode de reference pour la feuille de route a l'horizon 2030. Wkly Epidemiol Rec [Internet]. 2021 Sep 3 [cited 2022 Feb 3];96(35):401–20.
6. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas. 2021;10:10.
7. Andrade MC, Ferreti Bonan PR, Hilan E, Marques NP, Guimarães-Carvalho SF, Martelli H. COVID-19 Pandemic Causes Increased Clinic Visits with Diagnosis of Tegumentary Leishmaniasis in Brazil in 2020. Int J Infect Dis [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Feb 3];113:87.
8. Name RQ, Sampaio JHD, Borges KT, Tauil PL, Nogueira LSC, Sampaio RNR. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil. An Bras Dermatol. 2005;80(3):249–54.

9. Velozo D, Cabral A, Ribeiro MCM, Da Motta JDOC, Costa IMC, Sampaio RNR. Fatal mucosal leishmaniasis in a child. *An Bras Dermatol*. 2006;81(3):255–9.
10. Basano S de A, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol [Internet]*. 2004;7(3):328–37.
11. Marsden PD. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Rev Soc Bras Med Trop [Internet]*. 1985;18(3):187–98.
12. Soto J, Toledo J, Vega J, Berman J. Short report: Efficacy of pentavalent antimony for treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(4):421–2.
13. Lima EB De, Porto C, Motta JOC Da, Sampaio RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *An Bras Dermatol*. 2007;82(2):111–24.
14. Romero GAS, Molinet FJL, Noronha EF. Early enlargement of an ulcerated area during leishmaniasis treatment with meglumine antimoniate in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013;107(4):266–8.
15. Nacher M, Carme B, Sainte Marie D, Couppie P, Clyti E, Guibert P, et al. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001 Jun;95(4):331–6.
16. De J, Carvalho P, Machado De Assis T, Simões TC, Cota G, Fundação ], et al. Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop [Internet]*. 2021 Jan 29 [cited 2022 Feb 7];54(04542020):1–9.
17. OPAS\_OMS. Programa Regional de Leishmanioses. Américas 2010-2017. 2013;44–50.

18. Santarem AAA, Greggianin GF, Debastiani RG, Ribeiro JBP, Polli DA, Sampaio RNR, et al. Effectiveness of miltefosine-pentoxifylline compared to miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in C57Bl/6 mice. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(4):517–20.
19. Brito G, Dourado M, Guimarães LH, Meireles E, Schriefer A, De Carvalho EM, et al. Oral pentoxifylline associated with pentavalent antimony: A randomized trial for cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(5):1155–9.
20. Coelho AC, Trinconi CT, Costa CHN, Uliana SRB. In Vitro and In Vivo Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis [Internet].* 2014 Jul 17;8(7):e2999.
21. Coelho AC, Trinconi CT, Costa CHN, Uliana SRB. In Vitro and In Vivo Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: Follow-Up. *PLoS Negl Trop Dis [Internet].* 2016 Jul 14;10(7):e0004720.
22. Silva JSF e. Ensaio clínico do miltefosine no tratamento de pacientes com leishmaniose mucosa. Brasília, DF; 2011. 104 p.
23. Da Costa Filho AV, Lucas ÍC, Sampaio RNR. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(4):424–7.
24. Martins SS, Barroso DH, Rodrigues BC, da Motta J de OC, Freire GSM, Pereira LI de A, et al. A Pilot Randomized Clinical Trial: Oral Miltefosine and Pentavalent Antimonials Associated With Pentoxifylline for the Treatment of American Tegumentary Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(July):1–9.

25. Clissold. AWSP. Pentoxifylline A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and its Therapeutic Efficacy. *Drugs*. 1987;34(2):50–97.
26. Brito G, Dourado M, Guimarães LH, Meireles E, Schriefer A, Marcelino De Carvalho E, et al. Oral Pentoxifylline Associated with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2017;96(5):1155–9.
27. Pinart M, Rueda JR, Romero GAS, Pinzón-Flórez CE, Osorio-Arango K, Silveira Maia-Elkhoury AN, et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;2020(8).
28. Brasil. Pentoxifilina no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Mucosa. Relatório Recom CONITEC. 2015;199:21.
29. Brito G, Dourado M, Polari L, Celestino D, Carvalho LP, Queiroz A, et al. Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(4):617–20.
30. Ribeiro JBP, Miranda-Vilela AL, Graziani D, Gomes MR de A, Amorim AAS, Garcia RD, et al. Evaluation of the efficacy of systemic miltefosine associated with photodynamic therapy with liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL/6 mice. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2015;13:282–90.
31. Ramaswamy P, Powers JG, Bhawan J, Polyak I, Gilchrest BA. Effective blue light photodynamic therapy does not affect cutaneous langerhans cell number or oxidatively damage DNA. *Dermatologic Surg*. 2014;40(9):979–87.
32. Guo Y, Zhang L, Cao F, Leng Y. Thermal treatment of hair for the synthesis of sustainable carbon quantum dots and the applications for sensing Hg<sup>2+</sup>. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(July):1–7.

33. Qu S, Wang X, Lu Q, Liu X, Wang L. A biocompatible fluorescent ink based on water-soluble luminescent carbon nanodots. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(49):12215–8.
34. Sun YP, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KAS, Pathak P, et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J Am Chem Soc.* 2006;128(24):7756–7.
35. Qiu H, Xu HT, Li X, Wang JQ, Wang Y. Preparation of Highly Photoluminescent Sulfur-doped Carbon Dots for Fe(III) Detection. *J Mater Chem A.* 2012;7939–44.
36. Rodrigues CV da S. Propriedades ópticas de C-dots produzidos a partir de resíduos da indústria cervejeira. Brasília; 2016. 51 p.
37. Mezziani MJ, Liu J, Liu Y, Chen M, Huang Y. Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. 2010;113(42):18110–4.
38. Mezziani MJ, Liu Y, Qi G, Sun Y. Carbon Dots for Optical Imaging in vivo. 2010;131(32):11308–9.
39. Tang J, Kong B, Wu H, Xu M, Wang Y, Wang Y, et al. Carbon Nanodots Featuring Efficient FRET for Real-Time Monitoring of Drug Delivery and Two-Photon Imaging. *Adv Mater [Internet].* 2013 Sep 1;25(45):6569–74.
40. Liu Z, Robinson JT, Sun X, Dai H. PEGylated Nanographene Oxide for Delivery of Water-Insoluble Cancer Drugs. *J Am Chem Soc [Internet].* 2008 Aug 1;130(33):10876–7.
41. Horst FH, Rodrigues CV da S, Carvalho PPHR, Leite AM, Azevedo RB, Neto BAD, et al. From cow manure to bioactive carbon dots: a light-up probe for bioimaging investigations, glucose detection and potential immunotherapy agent for melanoma skin cancer. *RSC Adv.* 2021;11(11):6346–52.

42. Kumar VB, Dolitzky A, Michaeli S, Gedanken A. Antiparasitic Ointment Based on a Biocompatible Carbon Dot Nanocomposite. *ACS Appl Nano Mater*. 2018 Apr 27;1(4):1784–91.
43. Araujo AP, Giorgio S. Immunohistochemical evidence of stress and inflammatory markers in mouse models of cutaneous leishmaniosis. *Arch Dermatol Res [Internet]*. 2015;307(8):671–82.
44. Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(8):1457–67.
45. Borges TK dos S. Tatiana Karla Dos Santos Borges. Universidade de Brasília; 2013.
46. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response - Nature Immunology. *Nat Immunol [Internet]*. 2001;2(10):907–16.
47. Couto SCP. Shirley Claudino Pereira Couto Efeito da pentoxifilina nas vias canônica e não canônica do NF- kB determinantes de resposta inflamatória em modelos suscetíveis ou não à malária cerebral. Universidade de Brasília; 2022.
48. Van Der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(8):1491–500.
49. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett*. 1995;369(2–3):131–5.
50. Andrade ZA, Reed SG, Roters SB, Sadigursky M. Immunopathology of experimental cutaneous Leishmaniasis. *Am J Pathol*. 1984;114(1):137–48.
51. Green, S J, M S Meltzer, J B Hibbs Jr CAN. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism - PubMed. *J Immunol [Internet]*. 1990;144(1):278–83.

52. Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos H, Von Zuben FJ, Yamada A, Augusto O. In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infect Immun*. 1998;66(2):807–14.
53. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15(1):323–50.
54. Alves ÉAR, Kückelhaus SAS, Ponte CB, Kückelhaus C dos S, Muniz-Junqueira MI, Sampaio RNR, et al. Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *Int Immunopharmacol [Internet]*. 2012;13(1):114–9.
55. Bogdan C, Gessner A, Werner S, Martin R. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol*. 1996;8(4):517–25.
56. Clark IA, Rockett KA. Nitric oxide and parasitic disease. *Adv Parasitol*. 1996;37:1–56.
57. Cabral F V., Pelegriño MT, Seabra AB, Ribeiro MS. Nitric-oxide releasing chitosan nanoparticles towards effective treatment of cutaneous leishmaniasis. *Nitric Oxide - Biol Chem [Internet]*. 2021;113–114(March):31–8.
58. Furtado RR, Soares DC, Prado AF, Farias LHS, Da Silva BJM, Rodrigues APD, et al. Constitutive nitric oxide synthase-like enzyme in two species involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasitol Int [Internet]*. 2021;83(April):102347.
59. Almeida-Souza F, Da Silva VD, Taniwaki NN, De Jesus Hardoim D, Mendonça Filho AR, De Freitas Moreira WF, et al. Nitric Oxide Induction in Peritoneal Macrophages by a 1,2,3-Triazole Derivative Improves Its Efficacy upon *Leishmania amazonensis* In Vitro Infection. *J Med Chem*. 2021 Sep 9;64(17):12691–704.

60. Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2009;1791(6):540–51.
61. Melo RCN, Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: Host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog*. 2012;8(7):6.
62. Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect*. 2009;11(2):181–90.
63. Rodríguez NE, Lockard RD, Turcotte EA, Araújo-Santos T, Bozza PT, Borges VM, et al. Lipid bodies accumulation in *Leishmania infantum*-infected C57BL/6 macrophages. *Parasite Immunol*. 2017;39(8):1–5.
64. Rabhi S, Rabhi I, Trentin B, Piquemal D, Regnault B, Goyard S, et al. Lipid droplet formation, their localization and dynamics during *leishmania major* macrophage infection. *PLoS One*. 2016;11(2):1–19.
65. Gomes CM, Cesetti V, Paula A De. Field validation of SYBR® Green- and TaqMan®-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in a *Leishmania (V.) braziliensis*-endemic area. 2017;55(2):526–34.
66. Sevilha-Santos L, dos Santos Júnior ACM, Medeiros-Silva V, Bergmann JO, da Silva EF, Segato LF, et al. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2018;2–7.
67. Vieira ACM. Hidrogéis superabsorventes de biomassa do cerrado: síntese e caracterização. Universidade de Brasília; 2015.



68. Vilela FJ. Desenvolvimento de um Condicionador de Solos com valor agregado a partir da biomassa de *Magonia pubescens*. Universidade de Brasília; 2017.
69. Mendes JM. Ação leishmanicida de extratos de plantas no desenvolvimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e estudo do perfil metabólico utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Universidade Federal de Goiás; 2006.
70. Fernandes FF, D WB, Freitas EP. Toxicity of Extract of *Magonia pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. to Control the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae). *Neotrop Entomol.* 2008;37(2):205–8.
71. Medeiros-Silva V, Gurgel-Gonçalves R, Nitz N, D'Anduraim Morales LE, Cruz LM, Sobral IG, et al. Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs. *BMC Vet Res [Internet]*. 2015;11(1):1–7.
72. Torrentera FA, Lambot MA, Laman JD, Van Meurs M, Kiss R, Noël JC, et al. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(3):273–9.
73. Amini M, Nahrevanian H, Farahmand M. *Ar ch Ar ch ive. Iran J Parasitol.* 2008;3(May 2008):51–9.
74. Falú MA, Fernanda M, Bustos G, María C, Ramoneda P, Raspi EM De, et al. Susceptibility of different mouse strains to *Leishmania amazonensis* infection. 2007;1–6.
75. Magalhães LE. A ciência e os animais de laboratório. *Resbcal.* 2012;1:7–13.

76. Romero GAS, Sampaio RNR, De Oliveira Macêdo V, Marsden PD. Sensitivity of a Vacuum Aspiratory Culture Technique for Diagnosis of Localized Cutaneous Leishmaniasis in an Endemic Area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(4):505–8.
77. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *Parasites and Vectors*. 2012;5(1):1–9.
78. Muniz-Junqueira MI, Prata A, Tosta CE. Phagocytic and bactericidal function of mouse macrophages to *Salmonella typhimurium* in schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1992 Feb;46(2):132–6.
79. Couto SCP. Influência do tratamento com os antiplasmodiais artemeter, lumefantrina e mefloquina em funções dos monócitos envolvidas na defesa contra as formas eritrocitárias do *Plasmodium falciparum*. Universidade de Brasília; 2015.
80. Alves EAR. Influência do tratamento com inibidores da protease do Vírus da Imunodeficiência Humana sobre funções de macrófagos peritoneais murinos incubados in vitro com *Leishmania (L.) amazonensis*. Brasília, DF; 2013. 136 p.
81. Alves EAR, de Miranda MG, Borges TK, Magalhães KG, Muniz-Junqueira MI. Anti-HIV drugs, lopinavir/ritonavir and atazanavir, modulate innate immune response triggered by *Leishmania* in macrophages: The role of NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$ . *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2018 Aug 8];24(2):314–24.
82. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1981;78(12):7764–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.78.12.7764>

83. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci* [Internet]. 2011;2(1):21.
84. Jara M, Aduai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1826–33.
85. Barbosa VT, Silva MAG, Sousa MG, Gering AP, Santos HD, Laus JL. Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2012;64(6):1465–70.
86. Aquino TA, Sales Martins S, Gomes CM, Oliveira J De, Da Motta C, Graziani D, et al. First Case Report of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in a Brazilian Patient Treated with Adalimumab. *J Clin Exp Dermatol Res* [Internet]. 2014;5(6):5–7.
87. Agrawal LCV, Brig Zile Singh. Miltefosine : First Oral Drug for Treatment of Visceral. *Med J Armed Forces India* [Internet]. 2006;62(1):66–7.
88. Bhattacharya SK, Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, et al. Efficacy and Tolerability of Miltefosine for Childhood Visceral Leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2004;38(2):217–21.

## ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

PROCESSO APROVADO NO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS	
DATA DE ENTRADA	18 de novembro de 2015
Nome do Responsável	Raimunda N. R. Sampaio
Matrícula FUB	
UnBDoc nº	148305/2015
Título do Projeto	"Estudo experimental da eficácia da associação do miltefosine, da pentoxifilina e do imiquimod no tratamento de leishmaniose cutânea causada por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> em camundongos BALB/c."

Gabriel Soares Rodrigues de Lima

Matrícula 1048279

Secretário da CEUA/IB

[ceua@unb.br](mailto:ceua@unb.br)

**ANEXO B – APROVAÇÃO ADICIONAL PELO COMITÊ DE ÉTICA**

**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 1º de fevereiro de 2016.



**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DA NANOFORMULAÇÃO COMPOSTA POR C-DOTS E ANFOTERICINA B (ANFOB@C-DOT) NO TRATAMENTO CONTRA LEISHMANIOSE**", UnBDoC n.º 8480/2016, sob responsabilidade do Professor Marcelo Oliveira Rodrigues foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Camundongos BALB/C: 30*. A presente aprovação é válida pelo período de 15/04/2016 a 15/01/2017.



*Djane Braz Duarte*  
Prof.ª. Dra. Djane Braz Duarte

Vice-Coordenadora da CEUA – UnB

\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## ANEXO C – PREMIAÇÃO INTERNACIONAL RECEBIDA PELA AUTORA DO PROJETO



Encontro Internacional  
de Inovação em Saúde  
do Distrito Federal

Da Pesquisa Científica à Tecnologias Imersivas



# CERTIFICADO

Certificamos que o Premio de Segundo lugar, como o melhor trabalho, na modalidade oral, foi **RESULTADOS DA ASSOCIAÇÃO DE MEDICAMENTOS ORAIS E TERAPIA FOTODINÂMICA COM NANODROGA NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM CAMUNDONGOS BALB/c.**

apresentado por, Viviane Medeiros Silva e com os demais co-autores **SEVILHA-SANTOS,L; BERGMANN,J.O; RODRIGUES,C.V.S; VIEIRA,A.C.M; LIMA,B.D; GOMES,C.M; BRUM,S.S; RODRIGUES,M.O; SAMPAIO,R.N.R** no I Encontro Internacional de Inovação em Saúde do Distrito Federal, que ocorreu entre os dias 18 à 20 de Outubro de 2018, na Faculdade de Medicina, FM, *Campus* Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

*Dr. José Roberto S. A. Leite*  
Faculdade de Medicina  
Presidente da Comissão científica

*Dr. Rodrigo Gurgel*  
Faculdade de Medicina  
Coordenador Geral do Encontro

Organização

Brasília, DF, 20 de Outubro de 2018.





Fomento



## ANEXO D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

Clinical Microbiology and Infection 25 (2019) 242–247



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: [www.clinicalmicrobiologyandinfection.com](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com)



Original article

### Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis

L. Sevilha-Santos<sup>1</sup>, A.C.M. dos Santos Júnior<sup>2</sup>, V. Medeiros-Silva<sup>3</sup>, J.O. Bergmann<sup>1</sup>, E.F. da Silva<sup>4</sup>, L.F. Segato<sup>5</sup>, A.Y.M. Arabi<sup>6</sup>, N.A. de Paula<sup>7</sup>, R.N.R. Sampaio<sup>1,3,8</sup>, B.D. Lima<sup>9</sup>, C.M. Gomes<sup>1,5,8,10,\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Molecular Pathology, Faculty of Medicine, University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil

<sup>3</sup> Postgraduate Program in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil

<sup>4</sup> Department of Statistics, University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil

<sup>5</sup> Dermatology Division, University Hospital of Brasília (HUB), University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil

<sup>6</sup> Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>7</sup> Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Dermatology Division, Department of Medical Clinics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>8</sup> Dermatocology Laboratory, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>9</sup> Gene Biology Laboratory, Postgraduate Program in Microbial Biology, Cell Biology Department, Biological Sciences Institute, University of Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

<sup>10</sup> Tropical Medicine Nucleus, University of Brasília, Brasília, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 6 January 2018

Received in revised form

19 April 2018

Accepted 24 April 2018

Available online 3 May 2018

Editor: S.J. Cutler

##### Keywords:

Cutaneous

Diagnosis

Leishmaniasis

Polymerase chain reaction

#### ABSTRACT

**Objectives:** Superficial swab sampling of American tegumentary leishmaniasis (ATL) lesions shows higher amounts of *Leishmania* than those from biopsy. Subcutaneous involvement is also important in ATL, but parasite quantification according to lesion depth has not been evaluated. We aim to present the best depth at which sampling should be performed for molecular exams of ATL.

**Methods:** Patients with a clinical presentation compatible with ATL were allocated to ATL and control groups. Qualitative and quantitative qPCR assays were performed using SYBR Green and primers amplifying the kDNA minicircle of *Leishmania* spp. in different skin layers, including the epidermis, the superior dermis, the inferior dermis, and the hypodermis.

**Results:** Fifty-nine patients were included in this study, including 40 who had been diagnosed with ATL and 19 controls. The number of parasites was greater in samples of the epidermis and superior dermis ( $159.1 \times 10^6$ , range 4.0–781.7, and  $75.4 \times 10^6$ , range 8.0–244.5, mean *Leishmania* parasite equivalents per  $\mu\text{g}$  of tissue DNA, respectively) than those in samples of the inferior dermis and hypodermis (54.6, range 8.0–256.6, and  $16.8 \times 10^6$ , range 8.0–24.1, mean *Leishmania* parasite equivalents per  $\mu\text{g}$  of tissue DNA, respectively). The best diagnostic accuracy was achieved in the superior dermis (77.9%) and was significantly greater than that in the hypodermis (63.3%;  $p$  0.039).

**Conclusions:** We conclude that superficial sampling can retrieve a greater quantity of parasites. Future studies of the role of transepidermal elimination as a mechanism of host defence in ATL must be performed as there is a considerable quantity of *Leishmania* kDNA in the epidermis. **L. Sevilha-Santos, Clin Microbiol Infect 2019;25:242**

© 2018 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. C.M. Gomes, Hospital Universitário de Brasília SGAN 605, Av. L2 Norte, CEP: 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil. E-mail address: [ciromgomes@gmail.com](mailto:ciromgomes@gmail.com) (C.M. Gomes).

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.025>

1198-743X/© 2018 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## ANEXO E – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

# JEADV

Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology

# EADV

Letter to the Editor

### Accuracy of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction combined to a *Novy-MacNeal-Nicolle* medium culture for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis

J. Osiro Bergmann, A. de Castro Moreira dos Santos Júnior, L. Sevilha-Santos, V. Medeiros-Silva, C. Bresolin Pompeu, A. Youssif Mota Arabi, D. da Silva Marques, B. Caroline Vêras de Carvalho ... See all authors ▾

First published: 19 January 2019 | <https://doi.org/10.1111/jdv.15440> | Citations: 1

JEADV



LETTER TO THE EDITOR

#### Accuracy of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction combined to a *Novy-MacNeal-Nicolle* medium culture for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis

Dear Editor,

Tests used for the diagnosis of tegumentary leishmaniasis (TL) have variable accuracy and in classic parasitological methods, sensitivity tends to vary according to examiner-dependent factors.<sup>1</sup> *In vitro* culture is a highly specific method, but its sensitivity is limited.<sup>1,2</sup> Real-time PCR (qPCR) is considered a very efficient technique, and it adds quantitative results to clinical

analyses.<sup>3-5</sup> We aimed to test the accuracy of the combination of a *Novy-MacNeal-Nicolle* (NNN) medium culture and TaqMan-based qPCR analysis for the diagnosis of TL.

Sample size was calculated<sup>6,7</sup> considering a 70% prevalence of ATL in this population<sup>8,9</sup> with a null hypothesis for sensitivity set at 70%, an alternative hypothesis for sensitivity set at 90%, power set at  $\geq 80\%$  and the *P*-value set to be  $< 0.05$ . Patients with cutaneous lesions suspected of being TL were consecutively included from February 2017 to February 2018 (Fig. 1). All examinations were collected at the same time and were interpreted by blinded evaluators. Case and control definition was performed according to a composite reference standard as described elsewhere.<sup>4</sup>

For the index test, the preparation of the culture media was adapted according to the methodology described by Romero *et al.*<sup>8</sup> Culture material was withdrawn from a lesion edge

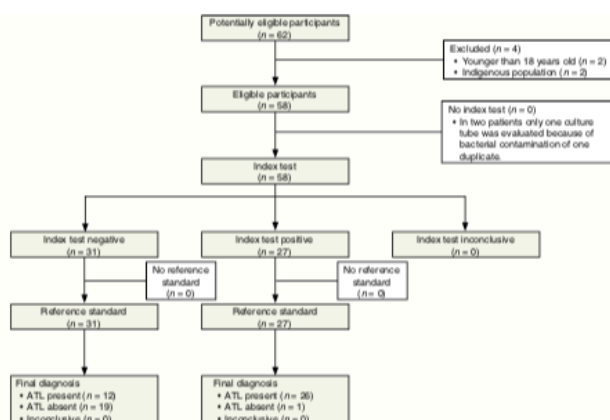


Figure 1 Flow diagram of study participants.



## ANEXO F – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO



Research letter

### Cross-sectional screening study for *Leishmania* DNA and antibodies in biologic-treated patients with psoriasis living in an area endemic for leishmaniasis

P.S. Kurizky , C.M. Gomes, M.V. Cesetti, G.A. Martins, N.A.T. Regattieri, F.F. Marianelli, L. Sevilha Santos, V. Medeiros Silva, N.A. de Paula, M.A.C. Frade, E.F. da Silva, L.M.H. da Mota

First published: 01 July 2019 | <https://doi.org/10.1111/bjd.18262> | Citations: 3



#### Research letter

##### Cross-sectional screening study for *Leishmania* DNA and antibodies in biologic-treated patients with psoriasis living in an area endemic for leishmaniasis

DOI: 10.1111/bjd.18262

**Dear Editor,** Biological drugs have revolutionized the control of immune-mediated diseases,<sup>1</sup> but most of the safety studies have not evaluated the risk of endemic infections, such as leishmaniasis, in underdeveloped regions.<sup>2</sup> The control of this parasite is strongly dependent on the production of specific cytokines [interleukin (IL)-1, IL-6 and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ],<sup>3</sup> which are important targets of biological therapies. Several reports have described cases of leishmaniasis in patients undergoing biological treatments,<sup>4</sup> but the real risk is unknown. We aimed to assess this risk by complementary evaluations (serology, conventional PCR and real-time PCR) in patients under treatment for psoriasis who were living in a region endemic for leishmaniasis in midwestern Brazil.

The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of UnB (CAAE: 72.312.117-4-0000.5.558). All patients signed an informed consent form.

This was a cross-sectional screening study, conducted from January 2018 until December 2018. Patients were allocated into one of four groups: 1: biologics (subdivided into TNF, IL-1/2/3 and IL-17A inhibitor groups); 2: conventional immunosuppressors (methotrexate); 3: nonimmunosuppressive treatment (nonsteroidal anti-inflammatory, acitretin, phototherapy and topical treatment); and 4: control (immunocompetent

participants without psoriasis). The probable positivity for leishmaniasis in our target population was set at 5%, with H0 of 50%, H1 of 90%, power > 0.8 and P < 0.05. Therefore, the minimal sample size was set at 300 individuals.<sup>5</sup>

Serum samples were subjected to indirect immunofluorescence (IgG against *Leishmania* *donovani*). Conventional and real-time PCR assays were performed on whole blood DNA using the primer pair 5'-GGCCACTATATTACACCAACCC-3' and 5'-GGGGTAGGGGCGTTCTGCGAA-3' (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), targeted to the minicircle kDNA of *Leishmania* spp.<sup>6,7</sup> All patients with at least one positive test underwent a complementary evaluation with blood cell counts, determination of the albumin/globulin ratio and abdominal ultrasonography examination. A Poisson regression model with robust variance was applied following a proposed hierarchical level. The software program SAS (Version 9.4 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used.

In total, 311 patients were included. No clinically active cases of leishmaniasis were found. Seven patients tested positive by serology, 13 tested positive by conventional PCR and 9 tested positive on real-time PCR (Table 1). In the biologics group, only patients using TNF inhibitors had positive results (Table 1). No significant difference was found between the three screening strategies. Socioeconomic factors (place of residence, recreation/labour-related risk factors) and associated comorbidities did not influence the positivity of the tests. Only the variable of suspected canine leishmaniasis had a significant association with the occurrence of at least one positive result in the multivariate model (prevalence ratio = 4.09; 95% confidence interval (CI) 1.13–14.76). Treatment group was not a significant variable.

**Table 1** Frequency of positivity in the three screening strategies evaluated in this study

Group (n)	Immunosuppressors (n)	Positivity (n)		
		Serology	PCR	Real-time PCR
Biologics (96)	Adalimumab (24), etanercept (29), anti-IL-12/23 (9), anti-IL-17A (9), secukinumab (9)	Etanercept (1)	Etanercept (1), infliximab (1)	Etanercept (2), L. braziliensis and L. amazonis, infliximab (1), L. braziliensis
Conventional immunosuppressors (94)	Methotrexate (94)	2	4	0
Nonimmunosuppressive treatment (69)	–	1	3	2 (L. braziliensis)
Control (52)	–	3	4	4 (L. braziliensis)
Total (311)	–	7	13	9

IL, interleukin; L. *Leishmania*; TNF, tumour necrosis factor. McNemar's test: conventional PCR  $\times$  real-time PCR = 0.423; PCR  $\times$  serology = 0.264; real-time PCR  $\times$  serology = 0.803.





## 2 Research letter

Use of immunosuppressive drugs can mask the clinical manifestations of infectious diseases, therefore it is important to evaluate asymptomatic carriers to predict prospectively their risk of developing active disease. The finding of circulating *Leishmania* kinetoplast (k)DNA does not necessarily indicate present or future active disease. Previous studies indicated that cell-free kDNA fragments can circulate in the blood of patients with active leishmaniasis and in those who only had contact with the parasite.<sup>8</sup> Most identified species (Table 1) had cutaneous tropism, an expected result as tegumentary leishmaniasis is more common than the visceral form of the disease.

In the future, medications could be optimized depending on the risk of acquiring determined infections. In this study, no patient using IL-17A or IL-12/23 tested positive for leishmaniasis. Unfortunately, the number of patients using these drugs was insufficient to detect any protective effect compared with use of TNF inhibitors.

After multivariate analysis, the only variable that significantly influenced the positivity of at least one of the screening tests was the presence of suspected canine leishmaniasis. This result calls attention to the fact that although immunological status is critical for the development of leishmaniasis, socio-environmental factors are probably much more important for disease transmission. It is well known that poor ecological conditions favour the maintenance of vectors and consequently the occurrence of the disease.<sup>3</sup>

Considering that all patients resided in areas endemic for leishmaniasis, our results suggest no increase in the prevalence of *Leishmania* infection in patients with psoriasis who are taking biologics. Although 121 patients (52 controls) were not using systemic immunosuppressors, conclusions about the relative prevalence of leishmaniasis in immunosuppressed subjects and healthy subjects are limited, and must be readdressed in a larger population. Despite the recent periurbanization of leishmaniasis in midwestern Brazil, contact with areas in which the vector is present is still the main risk factor for disease transmission. Immunosuppressed patients must take measures to avoid contact with vectors because active disease in those patients is considerably more severe.

P.S. Kurizky <sup>1,2</sup>, C.M. Gomes <sup>2</sup>, M.V. Cesetti,<sup>2</sup>  
G.A. Martins,<sup>1</sup> N.A.T. Regattieri,<sup>3</sup> F.F. Marianelli,<sup>3</sup> L. Sevilha Santos,<sup>2</sup> V. Medeiros Silva,<sup>4</sup> N.A. de Paula,<sup>5</sup> M.A.C. Frade <sup>5</sup>,  
E.F. da Silva<sup>6</sup> and L.M.H. da Mota <sup>2,7</sup>

<sup>1</sup>Dermatology Department and <sup>2</sup>Imaging and Diagnostics Department, Hospital Universitário de Brasília, Brasília, Brazil; <sup>3</sup>Diagnostic Dermatology Group, Núcleo de Medicina Tropical, Pós-graduação em Ciências Médicas, Laboratório de Dermatocologia, Faculdade de Medicina, Universidade de

Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brazil; <sup>4</sup>Postgraduate in Health Sciences, Laboratório de Dermatocologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brazil; <sup>5</sup>Dermatology Department, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>6</sup>Statistics Department and <sup>7</sup>Rheumatology Department, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brazil  
E-mail: patysha79@gmail.com

C.M.G. and L.M.H.d.M. contributed equally to this manuscript.

## References

- Arens K, Filippis C, Kleinfelder H et al. Anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  therapeutics differentially affect leishmania infection of human macrophages. *Front Immunol* 2018; **9**:1772.
- Torpiano P, Pace D. Leishmaniasis: diagnostic issues in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015; **13**:1123–38.
- Anversal L, Tibúrcio MGS, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. *Rev Assoc Med Bras* 2018; **64**:281–9.
- Besada E, Njålla RJ, Nossent JC. Imported case of visceral leishmaniasis presenting as pancytopenia in a Norwegian patient treated with methotrexate and etanercept for psoriasis arthritis. *Rheumatol Int* 2013; **33**:2687–9.
- Bujang MA, Adnan TH. Requirements for minimum sample size for sensitivity and specificity analysis. *J Clin Diagn Res* 2016; **10**:YE01–6.
- Sevilha-Santos L, Dos Santos Júnior ACM, Medeiros-Silva V et al. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* 2019; **25**:242–7.
- Gomes CM, Paula NA, Cesetti MV et al. Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of non invasive procedures in a L. (V.) braziliensis-endemic area. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; **79**:413–18.
- de Ruiter CM, van der Veer C, Leeflang MM et al. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol* 2014; **52**:3147–55.

Funding sources: This work was supported by a grant (process number 0193-001495/2017) from the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), by Fundo de Apoio à Dermatologia (Fundern) from the Sociedade Brasileira de Dermatologia, by the La Roche Posay Foundation Award and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Finance Code 001). LSS was supported by Master's degree grants from CAPES.

Conflicts of interest: In the previous 12 months, GAM and LMHdMta served as consultants for Janssen Biologics, AbbVie, Novartis Corp, Pfizer Inc. and Eli Lilly and received honoraria and payment for continuing medical education work related to psoriasis that was supported by Eli Lilly, Janssen, Novartis and AbbVie. The other authors have no conflicts of interest to declare.

## ANEXO G – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO



Letter To The Editor

### The risk of leprosy in patients using immunobiologics and conventional immunosuppressants for the treatment of dermatological and rheumatological diseases: a cohort study

C. Martins Gomes✉, M. Vicente Cesetti, L. Sevilha-Santos, G. Aires Martins, M.S. Cochrane Feitosa, V. Medeiros-Silva, N.A. de Paula, N. Ribeiro de Magalhães Alves, N. Gil-Jaramilo, C. Nunes de Araújo, M.A. Cipriani Frade, L.M.H. da Mota, E. Freitas da Silva, P. Shu Kurizky ... [See fewer authors](#) ^

First published: 21 June 2020 | <https://doi.org/10.1111/jdv.16764> | Citations: 2



DR. CIRO MARTINS GOMES (Orcid ID : 0000-0002-3069-6884)  
 PROF. MARCO ANDREY FRADE (Orcid ID : 0000-0003-2700-5971)  
 DR. PATRICIA SHU KURIZKY (Orcid ID : 0000-0002-5759-2727)

Article type : Letter to Editor

#### Letter to the Editor

The risk of leprosy in patients using immunobiologics and conventional immunosuppressants for the treatment of dermatological and rheumatological diseases: A cohort study.

**Keywords:** Psoriasis; Rheumatoid arthritis; Leprosy; Immunosuppression; Risk factors.

**Manuscript word count:** 588

**Table count:** 1

**Figure count:** 1

C Martins Gomes<sup>1,2</sup>, M Vicente Cesetti<sup>1</sup>, L Sevilha-Santos<sup>1</sup>, G Aires Martins<sup>3</sup>, MS Cochrane Feitosa<sup>2</sup>, V Medeiros-Silva<sup>4</sup>, NA de Paula<sup>5,6</sup>, N Ribeiro de Magalhães Alves<sup>1</sup>, N Gil-Jaramilo<sup>7</sup>, C Nunes de Araújo<sup>1,7</sup>, MA Ciprianni Frade<sup>5,6</sup>, LMH da Mota<sup>1,3</sup>, E Freitas da Silva<sup>8</sup>, P Shu Kurizky<sup>1,3</sup>.

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.
2. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.
3. Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as [doi: 10.1111/JDV.16764](https://doi.org/10.1111/JDV.16764)

This article is protected by copyright. All rights reserved

## ANEXO H – PEDIDO DE REGISTRO DE PATENTE

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

Número do Processo: BR 10 2020 002162 1

**Dados do Depositante (71)**

---

**Depositante 1 de 2****Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 00038174000143**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** CENTRO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO -  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY  
RIBEIRO, EDIFÍCIO CDT, ASA NORTE**Cidade:** Brasília**Estado:** DF**CEP:** 70904-970**País:** Brasil**Telefone:** (61)3107-4100/4137**Fax:****Email:** nupitec@cdt.unb.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 31/01/2020 às 15:07, Petição 870200015087

**Depositante 2 de 2****Nome ou Razão Social:** KRILLTECH SOLUÇÕES SUSTENTÁVEIS EM ENGENHARIA LTDA**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 33622815000161**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Empresa de Pequeno Porte assim definidas em lei**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO, EDIFÍCIO CDT SALA  
AT 39/17**Cidade:** Brasília**Estado:** DF**CEP:** 70910-900**País:** BRASIL**Telefone:** (61) 792 55841**Fax:****Email:** krilltechss@krilltechss.com**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** NANOFORMULAÇÃO BASEADA EM CARBON-DOTS E ANFOTERICINA B, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES PARASITARIAS, BACTERIANAS E FÚNGICAS**Resumo:** A presente invenção situa-se no campo da química farmacêutica. Trata-se de uma nanoformulação baseada em Carbon-Dots (C-Dots) e Anfotericina B (AnB), obtidos a partir da ligação da Anfotericina B na superfície de Carbon-Dots modificados com grupos borônicos e sua utilização no tratamento de infecções parasitárias, bacterianas e fúngicas.**Figura a publicar:** 2

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 20****Nome:** MARCELO OLIVEIRA RODRIGUES**CPF:** 97200611549**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Fielca:** Professor do ensino profissional**Endereço:** Colina UnB, Bloco A, Apt 11, Asa Norte**Cidade:** Brasília**Estado:** DF**CEP:** 70904-101**País:** BRASIL**Telefone:** (61) 310 74137**Fax:****Email:** marcelozohio@unb.br**Inventor 2 de 20****Nome:** LUANA MARIA MAGALHÃES DE SOUZA BRANDÃO**CPF:** 04659394140**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Fielca:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins**Endereço:** QSS 16 lote 311 Apt 101 - Taguatinga**Cidade:** Brasília**Estado:** DF**CEP:** 72025-660**País:** BRASIL**Telefone:** (61) 310 74137**Fax:****Email:** lmmsbrandao@gmail.com**Inventor 3 de 20**

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 31/01/2020 às 15:07, Petição 870200015087

**Nome:** IZABEL CRISTINA RODRIGUES DA SILVA

**CPF:** 77997808191

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Fielca:** Professor do ensino profissional

**Endereço:** Avenida Araucárias 4400, bloco C, apto 907, Via Enseada , Águas Claras

**Cidade:** Brasília

**Estado:** DF

**CEP:** 71936-250

**País:** BRASIL

**Telefone:** (61) 310 74137

**Fax:**

**Email:** belsilva@unb.br

**Inventor 4 de 20**

**Nome:** FREDERICO HILLESHEIM HORST

**CPF:** 04112321180

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Fielca:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** SCR N 716, Bloco F, Entrada 34, Kitnet 304 – Asa Norte

**Cidade:** Brasília

**Estado:** DF

**CEP:** 70770-660

**País:** BRASIL

**Telefone:** (61) 310 74137

**Fax:**

**Email:** fredhhorst@unb.br

**Inventor 5 de 20**

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 31/01/2020 às 15:07, Petição 870200015087

**Nome:** VIVIANE MEDEIROS SILVA

**CPF:** 00002395185

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Rua Copaliba, Lote 01, Torre C, apto 511 , Century Plaza, Águas Claras

**Cidade:** Brasília

**Estado:** DF

**CEP:** 71919-540

**País:** BRASIL

**Telefone:** (61) 310 74 137

**Fax:**

**Email:** vianemedeiros@unb.br

**Inventor 6 de 20**

**Nome:** CIRO MARTINS GOMES

**CPF:** 72524332187

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** SQNW 107, bloco B, apto 320, Setor Noroeste

**Cidade:** Brasília

**Estado:** DF

**CEP:** 70686-060

**País:** BRASIL

**Telefone:** (61) 310 74 137

**Fax:**

**Email:** cirogomes@unb.br

**Inventor 7 de 20**

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 31/01/2020 às 15:07, Petição 870200015087



## ANEXO I – REGISTRO DE PATENTE



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020002162-1 A2



(22) Data do Depósito: 31/01/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 03/08/2021

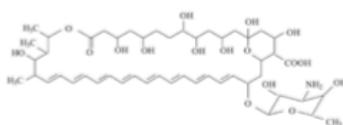
(54) **Título:** NANOFORMULAÇÃO BASEADA EM CARBON-DOTS E ANFOTERICINA B, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES PARASITARIAS, BACTERIANAS E FÚNGICAS

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/69; A61K 31/7048; A61K 47/30; C01B 32/15; A61P 31/10; (...).

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA; KRILLTECH SOLUÇÕES SUSTENTÁVEIS EM ENGENHARIA LTDA.

(72) **Inventor(es):** MARCELO OLIVEIRA RODRIGUES; LUANA MARIA MAGALHÃES DE SOUZA BRANDÃO; IZABEL CRISTINA RODRIGUES DA SILVA; FREDERICO HILLESHEIM HORST; VIVIANE MEDEIROS SILVA; CIRO MARTINS GOMES; CARIME VITÓRIA DA SILVA RODRIGUES; PAULO EDUARDO NARCIZO DE SOUZA; JAQUELINE OSIRO BERGMANN; RICARDO BENTES DE AZEVEDO; SACHA BRAUN CHAVES; LAÍS SEVILHA DOS SANTOS; DANIEL OLIVEIRA FREIRE; RAIMUNDA NONATA RIBEIRO SAMPAIO; MARIA DE SOUSA BRITO NETA; ROGÉRIO GOMES FARIA; BRENNO AMARO DA SILVEIRA NETO; SARAH SILVA BRUM; ATAÍLSON OLIVEIRA DA SILVA; NARA KANZAKI.

(57) **Resumo:** NANOFORMULAÇÃO BASEADA EM CARBON-DOTS E ANFOTERICINA B, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES PARASITARIAS, BACTERIANAS E FÚNGICAS. A presente invenção situa-se no campo da química farmacêutica. Trata-se de uma nanoformulação baseada em Carbon-Dots (C-Dots) e Anfotericina B (AnB), obtidos a partir da ligação da Anfotericina B na superfície de Carbon-Dots modificados com grupos borônicos e sua utilização no tratamento de infecções parasitárias, bacterianas e fúngicas.



1/42

**NANOFORMULAÇÃO BASEADA EM CARBON-DOTS E ANFOTERICINA B,  
SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO  
DE INFECÇÕES PARASITARIAS, BACTERIANAS E FÚNGICAS**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção situa-se no campo da química farmacêutica. Trata-se de uma nanoformulação baseada em Carbon-Dots (C-Dots) e Anfotericina B (AnB), obtidos a partir da ligação da Anfotericina B na superfície de Carbon-Dots modificados com grupos borônicos e sua utilização no tratamento de infecções parasitárias, bacterianas e fúngicas.

**ESTADO DA TÉCNICA**

[002] Isolada pela primeira vez em 1955 da bactéria *Streptomyces nodosus*, a Anfotericina B - AnB, é um dos cerca de 200 antimicóticos poliênicos isolados de fontes naturais já descritos (LEMKE, A.; KIDERLEN, F.; KAYSER, O. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68: 151-162, 2005).

[003] A AnB apresenta amplo espectro de atividade antifúngica e antiparasitária sendo empregada no tratamento de diversas infecções fúngicas sistêmicas causadas por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, bem como meningite fúngica em pacientes imunossuprimidos como, por exemplo, portadores do vírus HIV e/ou submetidos a tratamento quimioterápico, provocada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e, também, para o tratamento de eumicetoma causada pelos fungos *Madurella mycetomatis*, *Magnaporthe grisea*, *Pseudosporium boydii*, e *Lasimorpha senegalensis*.

2/42

(ALSINA-GIBERT, Mercè; LÓPEZ-LERMA, Ingrid; MARTINEZ-CHAMORRO, Esteban. *Archives of Dermatology*, 142(6):781-798, 2006; NETT, Jeniel; ANDES, David. *Infectious Disease Clinics of North America*, 16:163-186, 2016; REWARI, Bb; PUROHIT, Vimlesh; CHHABRA, Rm; BHAGWAN, Jai. *Journal of the Association of Physicians of India*, 56:699-708, 2008).

**[004]** Além do tratamento de micoses sistêmicas, a AnB tem sido usada no tratamento de doenças induzidas por parasitas como *Trypanosoma cruzi* (Doença de chagas), protozoários do gênero *leishmania* (Leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea), *Naegleria fowleri* (Meningoencefalite Amebiana Primária) (GRACE, Eddie; ASBILL, Scott; VIRGA, Kris. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59:6677-6681, 2015) e *Balamuthia mandrillaris* (encefalites amebianas) (LEMKE, Andreas; KIDERLEN, Albrecht; PETRI, Boris; KAYSER, Oliver. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6: 597-603, 2010).

**[005]** O mecanismo de ação da AnB consiste na afinidade do fármaco por moléculas específicas presentes nas membranas celulares. Ao formar complexo com esteróis (ergosterol e colesterol) a AnB perturba a integridade da membrana plasmática, resultando no surgimento de poros que acarretam no vazamento do conteúdo intracelular induzindo, dessa forma, a morte do microrganismo (HAMILL, Richard; *Drugs*, 73:919-934, 2013).

**[006]** Além disso, de acordo com recentes relatos, a atividade antimicrobiana da AnB pode também estar

3/42

relacionada a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Uma das teorias que explicam a formação de ROS é relacionada a via metabólica da respiração celular envolvendo as mitocôndrias. O acúmulo de radicais pode causar efeitos danosos a componentes como proteínas, DNA e membrana (HAMILL, Richard; *Drugs*, 73:919-934, 2013).

[007] Apesar de ser amplamente utilizada para o tratamento de infecções, a AnB é pouco solúvel em água em pH fisiológico. Tal característica é de suma importância tendo em vista que a insolubilidade do composto pode ocasionar a formação de agregados em decorrência das interações das cadeias de polímeros da AnB (estrutura da AnB mostrada na **Figura 1**) (LEMKE, A.; KIDERLEN, F.; KAYSER, O. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68: 151-162, 2005).

[008] Considerando que a concentração micelar crítica (CMC) da AnB é de cerca de 3  $\mu\text{M}$  e que a quantidade necessária para o tratamento é de 1 a 4  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  para a leishmaniose cutânea, por exemplo, (MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana*, 2010) fica evidente que a terapia com AnB pura é inviável em virtude da formação de agregados. A esse respeito cabe salientar que a formação de agregados pode resultar em bioacumulação desse medicamento, que por sua vez resulta em efeitos colaterais severos em virtude de alterações na absorção e farmacocinética da AnB (TORRADO et al., *Journal of Pharmaceutical Science*, 97:2405-2425, 2008). Tais efeitos podem ser categorizados em: agudos (dores

4/42

de cabeça, letargia, confusão mental, agitação, vômitos, dores abdominais, diarreia, mialgias, hipotensão/hipertensão arterial, e febre) e subagudos (relacionados às disfunções e falência renais associados a hipocalemia, hipomagnesemia e anemia).

**[009]** Stein e colaboradores (2008) mostram que cerca de 80% de pacientes submetidos a tratamento com AnB apresentam efeitos colaterais agudos enquanto cerca de 30% apresentam disfunções renais (STEIN, James; HADIGAN, Colleen; BROWN, Todd; CHADWICK, Ellen; FEINBERG, Judith; FRIIS-MOLLER, Nina; GANESAN, Anuradha; GLESBY, Marchall; HARDY, David; KAPLAN, Robert; KIM, Peter; LO, Janet; MARTINEZ, Esteban; SOSMAN, James. *CHD in HIV Conference: Prevention*, 118:54-60, 2008).

**[010]** Nessa perspectiva é de extrema importância o desenvolvimento de novas formulações mais seguras que possibilitem a não formação de agregados, uma maior biodisponibilização e conseqüentemente a redução dos efeitos colaterais (BARWICZ, Joanna; CRISTIAN, Sylvie; GRUDA, Ilona. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36: 2310-2315, 1992).

**[011]** Nesse contexto, a utilização de sistema de carregamento da AnB usando sistemas nano e micro estruturados emergem como alternativas para redução de custos, aumento da concentração de AnB, minimização da toxicidade, principalmente nefrotoxicidade, e efeitos adversos relacionados a esse composto, e ampliação de sua janela terapêutica.

**[012]** Atualmente, as formulações baseadas em AnB sob as formas de micelas, lipossomos, complexos lipídicos,

5/42

e dispersão coloidal são desenvolvidas e comercializadas conforme explicitado pela **Tabela 1**. Essas formulações visam aumentar a solubilidade em meio aquoso e reduzir a elevada nefrotoxicidade da AnB.

**Tabela 1**

		SIGLA	ESTRUTURA	VIA DE ADMINISTRAÇÃO
CONVENCIONAL	AnB+	D-AnB	Micelas	Infusão
	Detergente			Intravenosa (IV)
LIPÍDICAS	Lipossomal	L-AnB	Lipossoma	Infusão
				Intravenosa (IV)
	Complexo Lipídico	ABLc	Fitas	Infusão
	Dispersão coloidal	ABCD	Discos	Intravenosa (IV)

**[013]** Dentre as diversas formulações apresentadas, as mais comumente utilizadas em tratamentos clínicos são a D-AnB (composta por 50 mg de AnB e 41 mg de desoxicolato de sódio), a ABLc (AnB/complexo fosfolipídico), a ABCD (AnB e sulfato de colesterol) e a L-AnB (50 mg de AnB integra um lipossomo unilamelar baseado em fosfolipídios) (**Tabela 1**). Essas formulações são administradas em pacientes sob a forma de infusão parenteral, que costumam ser mais onerosas e provocar maior desconforto ao paciente, uma vez que necessitam da internação (HAMILL, Richard. *Drugs*, 73:919-934, **2013**). Além disso, o tempo para infusão do medicamento pode durar de 4 a 24 horas (VAN DE VENA, H.; PAULUSSEN, C.; FEIJENSB, P.; MATHEEUSSEN, A.; ROMBAUT, P.; KAYAERT, P.; VANDENMOOTER, G.; WEYENBERG, W.; COSB, P.; MAESB, L.; LUDWIG, A. *Journal of Controlled Release*, 161:795-803, **2012**).

**[014]** As formulações ABLc e ABCD apresentam partículas com tamanhos de 115 nm e 100 nm,

6/42

respectivamente. Essas duas formulações apresentam eficácias similares ao D-AnB com a redução dos efeitos colaterais (LEMKE, A.; KIDERLEN, F.; KAYSER, O. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68: 151-162, **2005**). Isso pode ser justificado pela maior afinidade entre a AnB e os agentes dispersantes presentes em ambas formulações. No entanto, a administração do ABLC ou ABCD continua sendo em tempos elevados de infusão intravenosa com os pacientes sob regime de internação (FUKUI, Hiroshi; KOIKE, Tomohiro; NAKAGAWA, Takashi; SAHEKI, Akira; SONOKE, Satoru; TOMII, Yoshifumi; SEKI, Junzo Seki. *International Journal of Pharmaceutics*, 267:101-112, **2003**).

**[015]** Já na formulação L-AnB, a AnB está integrada em uma micela monolamelar a base fosfolipídios, lecitina, colesterol e sacarose, sendo um medicamento de alto custo considerado "padrão ouro" para o tratamento de infecções fúngicas em pacientes com neutropenia febril, infecções fúngicas sistêmicas refratárias à D-AnB e leishmaniose visceral (MYINT, Han. *Hospital Medicine*, 60:123-126, **1999**; ZEICHNER, Luis; MARR, Kieren; REX, John; COHEN, Stuart. *Reviews of anti-infective agents* 37:415-25, **2003**). Esse tipo de formulação também apresenta baixa nefrotoxicidade em comparação à D-AnB (BATES, DW; SU, L; YU, DT. *Clinical Infectious Diseases*, 32:686-693, **2001**) e redução significativa de reações associadas à infusão (WINGARD, John; WHITE, Mary; ANAISSIE, Elias; RAFFALLI, John; GOODMAN, Jesse; ARRIETA, Antonio. *Clinical Infectious Diseases*, 31:1155-1163, **2000**).

7/42

**[016]** Atualmente a formulação de AnB lipossomal é a primeira escolha no tratamento em países europeus. Já o L-AnB é o principal fármaco utilizado em países desenvolvidos para o tratamento da leishmaniose, devido a sua rápida ação, menor nefrotoxicidade e melhores resultados voltados para a cura. Porém, em países subdesenvolvidos o elevado custo da formulação L-AnB torna o tratamento da leishmaniose mais centrado nos custos do que em taxa de cura, eficácia e toxicidade (GASPANI, Sara; MILANI, Barbara. *Generics and Biosimilars Initiative Journal*, 2:60-62, 2013).

**[017]** Steimbach (2016), em seu estudo fármaco-econômico, realiza um comparativo do custo entre as formulações de AnB usadas em hospitais públicos de Curitiba (Paraná, Brasil) no tratamento de infecções fúngicas em pacientes de alta complexidade. Os resultados mostraram que os custos por paciente alcançam valores na ordem de R\$ 70.476,83, R\$ 181.259,72 e R\$ 353.302,97 com D-AnB, L-AnB e ABLIC, respectivamente (STEIMBACH, Laiza. *Análise de custo-efetividade das formulações de anfotericina B, Curitiba, 2016*).

**[018]** Vale destacar que o estudo realizado mostrou que as formulações lipídicas apresentam maiores incidências de cura e menores probabilidades de nefrotoxicidade e hemodiálise, ou seja, melhor perfil de efetividade e segurança do que a D-AnB. Esses dados indicam que a outra grande desvantagem de tais formulações de AnB reside nos preços comerciais praticados pelas indústrias farmacêuticas associados aos elevados custos dos tratamentos. Além disso, fica



8/42

evidente que essas formas farmacêuticas complexas necessitam ser aprimoradas para que a via de administração seja menos degradante aos pacientes. Esse último aspecto reflete-se na limitada aplicação dessas formulações em diversas outras patologias apesar do amplo potencial terapêutico inerente à AnB.

**[019]** Em relação às formulações mencionadas ressalta-se que os aspectos limitantes para o uso da AnB no tratamento de diversas patologias estão relacionados ao elevado custo e via de administração (L-AnB, ABCD e ABLC) ou efeitos adversos das formulações (D-AnB). Além disso, existe um número crescente de infecções sistêmicas causadas por microrganismos que apresentam resistência a agentes antifúngicos.

**[020]** A presente tecnologia supera as tecnologias apresentadas tendo em vista que a nanoformulação baseada em Carbon-Dots e AnB possibilita uma maior biodisponibilidade celular, uma vez que o seu tamanho reduzido viabiliza a absorção do fármaco. Dessa forma, o aumento da taxa de absorção e a elevada estabilidade em meio aquoso da formulação descritas nesta invenção resulta em atenuação dos efeitos colaterais devido à nefrotoxicidade.

**[021]** Ademais, a nanoformulação proposta na presente tecnologia pode apresentar eficiente atividade biológica contra fungos, bactérias com múltipla resistência a antibióticos como, por exemplo, KPC e protozoários do gênero *leishmania*. Além disso, apresenta uma concentração de AnB significativamente superior às

9/42

previamente descritas e pode ser administrada sob as formas de aerossol e tópica.

**[022]** Caldeira e colaboradores (2015) relatam o desenvolvimento de uma nanoemulsão a base de estearilamina, colesterol e AnB e avaliam sua eficácia em ensaios *in vitro* contra *Leishmania amazonensis* cutânea em comparação a formulação D-AnB. Os resultados mostraram que a nanoformulação apresenta atividade leishmanicida contra o protozoário em sua forma intracelular amastigota e menor toxicidade em relação a macrófagos (linhagem J774 ATCC/TIB-67TM) quando comparados ao fármaco padrão (CALDEIRA, Leila; FERNANDES, Flaviana; COSTA, Daniel; FRÉZARD, Frédéric; AFONSO, Luís; FERREIRA, Lucas. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70: 125-131, 2015).

**[023]** No estudo publicado por Álvarez e colaboradores (2017) são desenvolvidas formulações amorfas baseadas em AnB e desoxicolato. Os testes com dímeros, poli agregados de AnB e microesferas de albumina contendo AnB desoxicolato são realizados para tratamento oral e parenteral de infecções de *Trypanosoma cruzi* (ÁLVAREZ, Guzmán; PERDOMO, Cintya; CORONEL, Cathia; AGUILERA, Elena; VARELA, Javier; APARICIO, Gonzalo; ZOLESSI, Flavio; CABRERA, Nallely; VEJA, Celeste; ROLÓN, Miriam; ARIAS, Antonieta; MONTFORT, Ruy; CERECETTO, Hugo; GONZÁLEZ, Mercedes. *Molecules*, 22(5): 709, 2017). Os resultados mostram uma redução na ordem de 75% dos parasitas com tratamento oral com a formulação dimérica, enquanto o tratamento parenteral com microesferas de albumina contendo poli agregados de

10/42

AnB e desoxicolato apresentou resultados cerca de 4 vezes superior com a formulação dimérica.

**[024]** Lemke e colaboradores (2010) em estudos a respeito da entrega de nanosuspensão de AnB ao cérebro e determinação de sua atividade contra amebas de *Balamuthia mandrillaris* relataram sobre o uso da nanossuspensão a base de diversos surfactantes (polissorbato 80, polissorbato 30, colato de sódio, poloxamer 188 e 407). O grupo analisou o carreamento do fármaco para o cérebro e a atividade amebicida. Os resultados demonstram que a formulação a base de colato de sódio e polissorbato 80 transpuseram a barreira hematoencefálica mais eficientemente embora apresentarem menor atividade *in vitro* contra o parasita (LEMKE, Andreas; KIDERLEN, Albrecht; PETRI, Boris; KAYSER, Oliver. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6: 597-603, 2010). É importante salientar que a tecnologia proposta nesse documento difere-se da nanossuspensão proposta por Lemke e colaboradores (2010) por não possuir nenhuma espécie de surfactantes em sua formulação e possuir diâmetros na ordem de 20 vezes menor. Essas características indicam que a tecnologia proposta pode ser usada para tratamento de infecções cerebrais.

**[025]** Apesar desses estudos, o tratamento com formulações de AnB ainda é feito majoritariamente por via parenteral, o que gera desconforto ao paciente e custos de internação (STEIMBACH, Laiza. Análise de custo-efetividade das formulações de Anfotericina B, Curitiba, 2016).

11/42

**[026]** Em estudo clínico recente desenvolvido por Berdichevski e colaboradores (2006) foi investigado o grau de severidade de disfunções renais em pacientes de baixo risco submetidos ao tratamento com AnB. Os resultados mostraram que 31% dos pacientes investigados apresentaram falha renal aguda. Em razão da elevada afinidade por colesterol, a AnB forma poros nas membranas renais, o que acarreta em distúrbios severos no equilíbrio eletrolítico e perdas de trifosfato de adenosina citoplasmática. (BERDICHEVSKI, Roberto; LUIS, Luciano; CRESTANA, Leticia; MANFRO, Roberto. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 10(2):94-99, 2006).

**[027]** Devido a essa elevada nefrotoxicidade a AnB não é indicada em casos de pacientes com histórico de insuficiências renais ou em tratamentos que envolvam agentes que induzem hipocaliemia (diuréticos). A AnB também é contraindicada como co-medicação com outros fármacos potencialmente nefrotóxicos tais como, aminoglicosídeos, carbapenemos, etc.

**[028]** Baseado nos exemplos descritos anteriormente na literatura, o presente invento os superam no aspecto fundamental que inviabiliza o uso da AnB como droga de primeira escolha. A elevada solubilidade em água da invenção facilita a eliminação da AnB via trato urinário sem ocasionar efeitos colaterais nefrotóxicos como os descritos acima, uma vez que o uso da AnB associada aos Carbon-dots reduz a bioacumulação do fármaco em células dos microtúbulos renais. Essa característica reduz o risco de desenvolvimento de insuficiência renal em

12/42

pacientes sem histórico dessa patologia, porém submetidos a tratamentos com AnB. Além disso, o ancoramento da AnB nos Carbon-dots facilita o transporte do princípio ativo para dentro das células dos patógeno potencializando o efeito do fármaco.

**[029]** Em outro estudo, nanopartículas formadas por quitosana e condroitina são utilizadas por Ribeiro e colaboradores (2014) para o carreamento de AnB no tratamento de leishmaniose. Os ensaios *in vivo* desse estudo mostraram que essa nanoformulação minimiza significativamente a nefrotoxicidade e é 10 vezes mais seletiva que a AnB isolada (RIBEIRO, Tatiana; FRANCA, Juçara; FUSCALDI, Leonardo; SANTOS, Mara; DUARTE, Mariana; LAGE, Paula; MARTINS, Vivian; COSTA, Lourena; FERNANDES, Simone; CARDOSO, Valbert; CASTILHO, Rachel; SOTO, Manuel; TAVARES, Carlos; FARACO, André; COELHO, Eduardo; FUMAGALLI, Miguel. *International Journal of Nanomedicine*, 9:5341-5353, 2014).

**[030]** Ainda, o documento patentário WO2008/144888 relata a respeito do desenvolvimento de novas formulações de AnB com Polietilenoglicol (PEG) e polióxidos de etileno modificados com fosfolipídios e ésteres de ácidos graxos, sendo esses estáveis em fluido gástrico. Essa formulação permite que a AnB possa ser administrada por via oral em tratamentos de infecções fúngicas causadas por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Tal tecnologia indica que essa nova formulação oral apresenta resultados comparáveis ao tratamento parenteral com ABLC e sem sintomas de nefrotoxicidade.

13/42

**[031]** Entretanto, a presente invenção difere-se das duas descritas anteriormente em relação à estratégia de formulação de AnB, uma vez que, trata de nanoformulações em que a AnB é associada a Carbon-Dots, nanopartículas de carbono, que são biocompatíveis, não são bioacumulativas e não apresentam toxicidade, características que permitem o seu uso em formulações para carreamento de fármacos.

**[032]** As principais formulações dos fármacos utilizados no tratamento de leishmaniose são relatadas por alguns documentos patentários, sendo o documento patentário US6406713B relacionado ao fármaco ABLC e os documentos US5874104, US5965156 e CA1339008 relativos ao fármaco L-AnB. Essas formulações lipídicas, apresentam as limitações associadas à nefrotoxicidade, baixa solubilidade em meio fisiológico e tamanhos de partículas na ordem de micrómetros. Essas formulações além de causarem efeitos colaterais severos aos pacientes como dores de cabeça, febre e calafrios, devido à administração parenteral, têm alta tendência à aglomeração nos rins e fígado resultando na elevada toxicidade da AnB (ROBINSON, R.; NAHATA, M. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 24:249-257, 1999).

**[033]** Os documentos patentários US6770290B1, US8883748B2, US5965156, US66632443B2, EP1313449B1, WO2002069983A1, US20150297725A1, US2004/0137049A1, CA2438847A, 414/MUM/2008 relatam a respeito da utilização de micelas, complexos lipídicos e lipossomos para produção de novas formulações à base de AnB com efeitos similares aos das formulações comerciais.

**14/42**

Entretanto, os inventos descritos não utilizam em seu processo produtivo nanoformulações de Carbon-Dots em associação com AnB conforme utilizado no presente invento. Ademais, a presente tecnologia ao utilizar nanoformulações de Carbon-dots com Anfotericina B superam as tecnologias descritas em relação a elevada estabilidade e solubilidade em meio aquoso, baixas nefrotoxicidade e pela elevada versatilidade nos modos de administração. A formulação proposta de Carbon-Dots em associação com a AnB não precisa ser administrada por meio de longas infusões como requerido para formulações comerciais e as propostas nos documentos mencionados. Outro aspecto importante consiste na simplicidade para a preparação da formulação.

**[034]** A presente invenção também diferencia-se dos documentos patentários acima descritos por não se tratar de uma composição a base de micelas, complexos lipídico ou nanoemulsões ou quais quer ácidos graxos ou derivados e também por não utilizar micro/nanopartículas de polissacarídeos nem recorrer às estratégias de conjugação com polissacarídeos, polímeros hidrossolúveis ou nanotubos de carbono.

**[035]** Uma vez que a limitação em utilizar a AnB está associada à sua baixa solubilidade em meio aquoso, são apresentadas estratégias para aumentar a solubilidade de AnB em água, uma dessas estratégias consiste em realizar modificações na estrutura da AnB com a introdução de grupos ou moléculas altamente hidrofílicas (polissacarídeos e polímeros). Essa estratégia visa reduzir consideravelmente a nefrotoxicidade, os efeitos

15/42

adversos inerentes às infusões e possibilitar novas formas de administração da AnB (EHRENFREUND-KLEINMAN, T.; AZZAM, T.; FALK, R.; POLACHECK, I.; GOLENSER, J.; DOMB, A. *Biomaterials*, 23:1327-1335, 2002).

**[036]** Um dos primeiros trabalhos que relata essa estratégia foi desenvolvido por um grupo de pesquisa israelense em 1999 e consistiu em conjugar a AnB em um polissacarídeo altamente solúvel em água (FALK, Rama; DOMB, Abraham; POLACHECK, Itzhack. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:1975-1981, 1999). Nesse relato, a AnB foi conjugada através da reação de Schiff a arabinogalactana (AG) previamente oxidada seguido pela redução da imina formada com borohidreto de sódio.

**[037]** O conjugado foi estável em água em pH 11 e possui cerca de 1 mg.mL<sup>-1</sup> de AnB. Os ensaios de atividade antifúngica e de toxicidade *in vivo* indicaram que o conjugado AnB/AG foi similar ao L-AnB e muito mais seguro que a D-AnB. A dose máxima suportada por ratos foi de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> e a histopatologia não mostrou evidências de danos aos rins e fígado (FALK, Rama; DOMB, Abraham; POLACHECK, Itzhack. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:1975-1981, 1999).

**[038]** Essa mesma estratégia de conjugação foi descrita por Nish e colaboradores (2007), Kothandaraman e colaboradores (2017) e pelo documento patentário estadunidense US7115576B2 no qual a substituição do AG por HES (Amido hidroxietílico), pectina e goma arábica, respectivamente (NISHI, K.; ANTONY, M.; MOHAMAN, P.; ANIKUMAR, T.; LOISEAU, P.; JAYAKRISHNAN, A. *Pharmaceutical Research*, 24:971-980, 2007;



16/42

KOTHANDARAMAN, Gayathri; RAVICHANDRAN, Vasanthan; BORIES, Chistian. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 39:1-7, 2017).

**[039]** Entretanto, modificações estruturais na AnB para conjugação em AG, HES, pectina e goma arábica requerem diversas etapas que envolvem reações químicas para modificação dos polissacarídeos (suporte) e da própria AnB. Além disso, os processos descritos acima necessitam de etapas de purificação. Dessa forma, a presente invenção supera os inventos descritos, uma vez que, a associação da AnB à Carbon-Dots resulta em nanoformulações solúveis em água sem a necessidade de modificar a estrutura química do fármaco ou a utilização de surfactantes. Todo processo de preparação da nanoformulação é feito em uma única etapa sem necessidade de purificação do produto final.

**[040]** Ickowicz e colaboradores (2014) publicou uma série de experimentos em escala piloto para a produção de 100 g do complexo AnB/AG e avaliou a resposta terapêutica e tóxica dos produtos em distintos graus de redução *in vivo* e *in vitro* (ICKOWICZ, Diana; FARBER, Shimon; SIONOV, Edward; KAGAN, Sarah; HOFFMAN, Amnon; PALACHECK, Itzhack; DOMB, Abraham. *Biomacromolecules*, 15:2079-2089, 2014). Embora os resultados dos testes tenham sido promissores o processo de produção piloto do AnB/AG envolveu diversas etapas complexas e dispendiosas.

**[041]** Enquanto em escala laboratorial a reação de oxidação de AG foi realizada em duas horas de reação seguido pela purificação via cromatografia por exclusão

17/42

de tamanho para render um produto 60% oxidado, em escala piloto o mesmo grau de oxidação foi obtido envolvendo também uma diálise por 48 horas à 4°C, liofilização do produto, redissolução e um processo de ultrafiltração com 11 ciclos por 5 horas.

**[042]** No processo piloto de conjugação do AnB ao AG oxidado envolveu a formação da base de *Schiff* seguido pela redução do grupo imina, purificação por diálise, similarmente à escala laboratorial, porém o produto reacional foi submetido ainda a ultrafiltração e liofilização( ICKOWICZ, Diana; FARBER, Shimon; SIONOV, Edward; KAGAN, Sarah; HOFFMAN, Amnon; PALACHECK, Itzhack; DOMB, Abraham. *Biomacromolecules*, 15:2079-2089, **2014**). (ZHANG, Jia; YU, Shu-Hong. *Materials Today*, 19:382-393, **2015**).

**[043]** Wu e colaboradores (2005) relataram a simultânea conjugação da AnB e fluoresceína a nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT) com a justificativa de aumento da solubilidade em água, redução da formação de agregados, aumento da eficácia da AnB com o aumento da internalização proporcionada pelos nanotubos, modulação da atividade da AnB contra agentes patogênicos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida parapsilosis* (WU, Wei; WIECKOWSKI, Sébastien; PASTORIN, Giorgia; BENINCASA, Monica; KLUMPP, Cédric; BRIAND, Jean; GENNARO, Renato; PRATO, Maurizio; BIANCO, Alberto. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44:6358-6362, **2005**).

**[044]** No entanto, há que se considerar as desvantagens da utilização de nanotubos de carbono. Sua

18/42

síntese depende do uso de catalisadores contendo metais pesados, cujos resquícios podem ser o suficiente para uma ação tóxica. Outro fator é que, devido a sua baixa solubilidade, faz-se necessário o uso de surfactantes, que também podem ser fonte de toxicidade (LOH, Kian; BAO, Qiaoliang; EDA, Goki; CHHOWALLA, Manish. *Nature Chemistry*, 2:1015-1024, 2010).

**[045]** Assim sendo, a presente tecnologia supera os estudos descritos por não utilizar nanotubos de carbono, mas sim uma nanoformulação de Carbon-Dots associados a Anfotericina B e por não utilizar catalisadores compostos por metais pesados. Além disso, a nanoformulação de Carbon-Dots não apresenta toxicidade e não há necessidade de uso de surfactantes.

**[046]** A partir do exposto no estado da técnica, fica evidente que aumentar a solubilidade em meio aquoso da AnB é o aspecto central que limita o desenvolvimento de novas formulações que possibilitem vias alternativas de administração.

**[047]** Dessa forma, a presente invenção supera o estado da técnica por se tratar de nanoformulação baseada em Carbon-dots em que a AnB está ancorada na superfície das nanopartículas, resultando em um composto hidrossolúvel. A AnB@C-Dots (AnB ancorada na nanopartícula de Carbon-Dots) apresenta melhoras na biodisponibilidade e farmacocinética, em relação ao estado da técnica, e, por consequência, baixa toxicidade e melhor farmacoterapia.

**[048]** Além disso, a solubilidade em água proporcionada pelas nanoformulações desenvolvidas no

19/42

presente invento representa uma significativa vantagem no tratamento com AnB em virtude dos seguintes fatores: minimização de efeitos colaterais associados à infusão e nefrotoxicidade; melhoria da qualidade de vida do paciente; redução do tempo ou a não necessidade de internação do paciente; possibilidade de a AnB atuar com agente profilático; expansão da terapia da AnB em países subdesenvolvidos onde a população tem dificuldade de acesso a hospitais, além de possibilitar o tratamento por via enteral.

[049] Vale salientar que, caso a administração parenteral seja necessária, a AnB@C-Dots não necessita de longas infusões conforme indicado pela OMS para formulações comerciais.

[050] Isto posto, o Estado da Técnica não prevê ou sugere o desenvolvimento de nanoformulação baseada em Carbon-Dot e AnB e seu uso com ação antiparasitária e antifúngica, como apresentado na presente invenção.

#### **DESCRIÇÃO SUCINTA DAS FIGURAS**

[051] A invenção poderá ser mais bem compreendida com base nas Figuras de 1 a 13, cuja descrição segue abaixo:

[052] A **Figura 1** apresenta a estrutura molecular da Anfotericina B.

[053] A **Figura 2** apresenta o esquema de síntese dos Carbon-Dots.

[054] A **Figura 3** apresenta imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão dos Carbon-Dots a. À direita é inserido o histograma de distribuição de tamanhos da

20/42

amostra Carbon-Dots a e à esquerda é apresentada a ênfase nos parâmetros de rede de partícula representativa.

[055] A **Figura 4** apresenta os espectros de Infra Vermelho dos Carbon-Dots obtidos.

[056] A **Figura 5** apresenta à direita uma ilustração da formação das ligações éster boronato e à esquerda o gráfico de Stern-Volmer obtido para o sistema formado pelos Carbon-Dots a e diferentes concentrações de glicose.

[057] A **Figura 6** apresenta os espectros de absorção na região do UV-Vis e de emissão sob excitação de 370 nm dos Carbon-Dots a, Carbon-Dots b e Carbon-Dots c.

[058] A **Figura 7** apresenta à direita espectros de emissão de onda sob comprimentos de onda de excitação progressivamente maiores (de 320 nm a 460 nm) e à esquerda o histograma de intensidades de emissão em função do comprimento de onda de excitação.

[059] A **Figura 8** apresenta à direita os gráficos de fotoestabilidade dos Carbon-Dots a, adquiridos sob excitação de 370 e 810 nm e à esquerda o gráfico de porcentagem de carbono inorgânico pelo tempo transcorrido do preparo das soluções dos Carbon-Dots.

[060] A **Figura 9** apresenta à direita uma ilustração da formação das ligações éster boronato entre Carbon-Dot e Anfotericina B e à esquerda os espectros de emissão para o sistema formado pelos Carbon-Dots a e diferentes concentrações de AnB.

21/42

[061] A **Figura 10** apresenta o espectro de absorção na região do UV-Vis da AnB@C-Dots, D-AnB e AnB pura em DMSO.

[062] A **Figura 11** mostra o semeio da microdiluição em placas de cultura.

[063] A **Figura 12** reúne as imagens de microscopia de luz dos fígados de animais dos grupos "a" controle negativo, "b" D-AnB, "c" L-AnB e "d" AnB@C-Dots.

[064] A **Figura 13** reúne as imagens de microscopia de luz dos rins de animais dos grupos "a" controle negativo, "b" D-AnB, "c" L-AnB e "d" AnB@C-Dots.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[065] A presente invenção refere-se a uma nanoformulação baseada em Carbon-Dots e Anfotericina B, obtidos a partir da ligação da Anfotericina B na superfície de Carbon-Dots funcionalizados com grupos borônicos (ligação éster-boronato) e sua utilização no tratamento de infecções parasitárias, bacterianas e fúngicas.

[066] Uma das modalidades da presente invenção refere-se à nanoformulação constituída de nano partículas de Carbon-Dots funcionalizadas com grupos borônicos ligadas à Anfotericina B. Os Carbon-Dots são nanopartículas de carbono solúveis em água, assim, uma vez ligada à superfície dos Carbon-Dots, a AnB pode ser dispersa em meio aquoso, o que permite o seu uso em formulações terapêuticas, aumentando a biodisponibilidade. Além disso, Carbon-Dots possuem baixa toxicidade comprovada por estudos (HUANG, Xinglu;

22/42

ZHANG, Fan; ZHU, Lei; CHOI, Ki; GUO, Jinxia; TACKETT, Kenneth; ANILKUMAR, Parambath; LIU, Gang; QUAN, Qimeng; CHOI, Hak; NIU, Gang; SUN, Ya; LEE, Seulki; CHEN, Xiaoyuan. *ACS Nano*, 23: 5684-5693, 2013).

**[067]** Outra modalidade da presente invenção refere-se ao processo de obtenção das nanoformulações de Carbon-Dots, funcionalizados com grupos borônicos, associados a Anfotericina B.

**[068]** De forma geral, tal modalidade, pode ser compreendida por meio dos processos de obtenção de nanoformulação de Carbon-Dots e AnB, de acordo com as seguintes etapas:

**(A)** Formação de Carbon-Dots em um reator de micro-ondas;

**(B)** Ancoramento da AnB na superfície dos Carbon-Dots.

**[069]** A **Etapa A** consiste na dissolução de fontes de boro, nitrogênio e carbono tais como ácido cítrico, glicose, sacarose, ácido bórico, ureia, anilina, tiouréia, derivados fenilborônicos, etanolamina, dietilaminas, sendo preferencialmente o ácido cítrico, uréia e ácido bórico, em água e submetidos a reação em forno micro-ondas. Ácido cítrico, ureia e ácido bórico, em proporções variáveis entre 0,1 e 1 g, sendo preferencialmente 0,5 g, são dissolvidos em 15 mL de água destiladas e submetidos a reação em micro-ondas a temperatura entre 100 e 300 °C, preferencialmente 170 °C, por período entre 2 e 120 minutos, preferencialmente 30 minutos. A solução formada é filtrada e o solvente é removido por evaporação.

23/42

**[070]** A **Etapa B** consiste no ancoramento da AnB na superfície dos Carbon-Dots através de ligação éster boronato. Uma solução aquosa dos Carbon-Dots de concentração variável entre  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , e  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sendo preferencialmente  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , é misturada a uma solução saturada de AnB em dimetilsulfóxido (DMSO) sob constante agitação à temperatura ambiente. Ao final do processo as concentrações de AnB e de Carbon-Dots são de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em solução aquosa 1% de DMSO.

**[071]** Outra modalidade da presente invenção refere-se ao uso da nanoformulação proposta para a produção de medicamentos para o uso no tratamento de infecções parasitárias, bacterianas e fúngicas.

**[072]** O ancoramento da AnB na superfície dos Carbon-Dots aumenta a solubilidade do fármaco em água, permitindo melhor dispersão em fluidos biológicos e aumentando a biodisponibilidade do fármaco. Esse efeito evita a formação de aglomerados, responsáveis pela elevada toxicidade da AnB.

**[073]** Os testes de atividade biológica das nanoformulações propostas pela presente invenção mostram que a atividade da AnB é mantida, o que indica que a eficiência terapêutica não é perdida quando a AnB é associada aos Carbon-Dots. Além disso, os testes de toxicidade mostram que o uso da AnB associada aos Carbon-Dots não produz danos significativos aos tecidos dos rins e do fígado de camundongos, o que indica baixa toxicidade da nanoformulação.

#### **EXEMPLOS**



24/42

[074] Os exemplos abaixo são representados a fim de ilustrar a melhor execução da invenção. Vale destacar que a presente invenção não se limita aos exemplos citados, podendo ser utilizada em todas as aplicações descritas ou em quaisquer outras variações equivalentes.

**EXEMPLO 1: Síntese e caracterização dos Carbon-Dots**

[075] Os Carbon-Dots são obtidos por meio de síntese assistida por micro-ondas, conforme ilustrado na **Figura 2**. Inicialmente uma solução contendo 10 mL de água destilada, 0,5 g de ácido bórico, 0,5 g de uréia e 0,5 g de ácido cítrico é colocada em um reator de micro-ondas com volume de 30 mL e, em seguida, aquecida a 170 °C, por 30 minutos, com agitação de 600 rpm.

[076] A mistura é então resfriada até a temperatura ambiente e filtrada. A solução verde obtida é novamente aquecida a 60 °C até a completa evaporação do solvente. O sólido é lavado com etanol quatro vezes, para retirada de impurezas, e após a secagem, armazenado.

[077] O procedimento experimental é realizado em triplicata, para avaliação da reprodutibilidade do método de obtenção dos Carbon-Dots. Sendo assim, os produtos obtidos são chamados de Carbon-Dots a, Carbon-Dots b e Carbon-Dots c.

[078] O ponto de fusão dos Carbon-Dots é  $134 \pm 1,6$  °C. O desvio padrão relativamente pequeno é um indicativo de que a, b e c são compostos semelhantes e, portanto, o procedimento experimental é reprodutível.

[079] Na **Figura 3** são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de transmissão do Carbon-Dots,

25/42

onde são observadas partículas com morfologia aproximadamente esférica.

**[080]** As nanopartículas sintetizadas apresentam faixa de distribuição de tamanhos estreita, de 3 a 7 nm, como ilustrado pelo gráfico da **Figura 3 (a)**, com tamanho médio de  $4,5 \pm 0,68$  nm. Na **Figura 3 (b)** é possível visualizar retículos cristalinos e o parâmetro de rede médio de 2,40 Å, indicativos de que se trata de um material grafítico cristalino. Estas características permitem a utilização desses materiais em meio biológico como carreador de fármacos.

**[081]** Tendo em vista que a composição das superfícies das nanopartículas é um outro fator que interfere na aplicação do material, e que a presença de grupos de ácido borônico livres na superfície dos Carbon-Dots é o que vai permitir o ancoramento da AnB a partir da ligação entre estes grupos e o diol da AnB, os grupos funcionais presentes nas superfícies dos Carbon-Dots são determinados por Espectroscopia de Absorção na Região do Infra Vermelho. Na **Figura 4** são apresentados os espectros para os Carbon-Dots a, Carbon-Dots b e Carbon-Dots c, sendo observado a sobreposição dos três espectros indicando que são sintetizados materiais com características semelhantes, outro indicativo de que o método experimental utilizado é reprodutível.

**[082]** Nos espectros são observados picos centrados em 1350 e 1090  $\text{cm}^{-1}$  que se referem, respectivamente, aos estiramentos e dobramentos da ligação entre o boro e o oxigênio (B-O) e um sinal em 1030  $\text{cm}^{-1}$  referente aos estiramentos da ligação entre boro, oxigênio e carbono



## 26/42

(B-O-C). Esses sinais comprovam a presença de boro nas superfícies dos Carbon-Dots.

**[083]** O pico situado em  $1580\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação dupla entre carbonos (C=C), indica a existência da hibridização  $sp^2$  nas estruturas, característica em Carbon-Dots.

**[084]** E por fim, as bandas de absorção de alta intensidade centradas em  $3120\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao estiramento das ligações oxigênio e hidrogênio (O-H), que indica a presença de grupos oxigenados nas superfícies dos Carbon-Dots, estes grupos conferem às nanopartículas características hidrofílicas necessárias para interações fluídicas em sistemas biológicos.

**[085]** A presença de grupos de ácido borônico livres na superfície dos Carbon-Dots também é determinada por titulação com glicose. Os grupos ácidos borônicos possuem alta afinidade por grupos dióis, como os que fazem parte da estrutura da AnB e de açúcares como a glicose. Esses dois grupos formam uma ligação éster boronato reversível em ambiente aquoso e levemente alcalino. O grupo ácido borônico, inicialmente na forma trigonal e eletricamente neutro, após a formação da ligação covalente com a glicose, passa a ser carregado negativamente, conforme ilustra a **Figura 5 (A)**.

**[086]** As moléculas de glicose ligadas aos grupos borônicos promovem a interação entre as nanopartículas de Carbon-Dots devido à formação de ligação de hidrogênio entre as moléculas de glicose, que induz a formação de aglomerados que resultam no efeito *quenching*

27/42

da luminescência dos Carbon-Dots. (KIRAN, S.; MISRA, R. *Society for Biomaterials*, 103:2888-2897, 2015).

[087] Assim, é possível detectar a ocorrência dessas ligações, e até quantificar moléculas contendo o grupo diol usando-se Carbon-Dots. (LONG, Yijuan; WANG, Xiliang; SHEN, Dongjun; ZHENG, Huzhi. *Talanta*, 159:122-126, 2016).

[088] O gráfico de Stern-Volmer obtido para o sistema é exibido na **Figura 5 (B)**. A medida que a concentração de glicose aumenta, observava-se a diminuição da intensidade de fluorescência dos Carbon-Dots a em 470 nm, sob excitação de 370 nm. O processo de *quenching* da fluorescência da amostra Carbon-Dots a pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer (**Equação 1**), sendo que  $I_0$  é a intensidade de emissão dos Carbon-Dots em 470 nm, sob excitação de 370 nm,  $I$  é a intensidade de emissão dos Carbon-Dots na presença de diferentes concentrações de glicose,  $K_{SV}$  é a constante de *quenching* estático e  $[Q]$  é a concentração da substância que provoca o *quenching*, neste caso a glicose. A relação aproximadamente linear entre  $I_0/I$  e a concentração de glicose ( $R^2=0,95962$ ) indica que há apenas um tipo de fluoróforo em solução, (KIRAN, S.; MISRA, R. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103:2888-2897, 2015) o que indica que as nanopartículas têm comportamento homogêneo na presença de grupos diols.

**Equação 1-** Equação de Stern-Volm.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q]$$

28/42

[089] Nas análises espectroscópicas de absorção na região do UV-Vis, cujo gráfico é apresentado na **Figura 6**, as bandas de absorção centradas em 235 e 340 nm, referentes às transições  $n-\pi^*$  e  $\pi-\pi^*$ , confirmam a existência de um sistema  $\pi$  conjugado, frequentemente encontrado em Carbon-Dots dopados com boro.

[090] A **Figura 6** também expõe os espectros de emissão sob excitação de 370 nm das três amostras de Carbon-Dots, que possuem perfis idênticos. Sob essa excitação os máximos de emissão situam-se por volta de 450 nm, resultando na cor azul, como ilustra o diagrama de cromaticidade apresentado. A similaridade entre os resultados é mais um indicativo de que a metodologia experimental é reproduzível.

[091] Uma característica óptica marcante de Carbon-Dots é a emissão dependente da excitação. Os espectros obtidos sob comprimentos de onda de excitação variando de 320 a 460 nm dos Carbon-Dots a são exibidos na **Figura 7 (A)**. Os máximos de emissão deslocam-se de 445 a 540 nm, à medida que a excitação aumenta progressivamente de 320 a 460 nm. O deslocamento batocrômico de 95 nm é resultado da coexistência de Carbon-Dots de diferentes tamanhos na amostra e devido à ocorrência de diferentes estados superficiais produzidos por diferentes distribuições de grupos funcionais nas superfícies. (KIRAN, S.; MISRA, R. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103:2888-2897, 2015).

[092] Os comprimentos de onda que produzem maior intensidade de luminescência estão entre 360 e 390 nm, como ilustra o histograma da **Figura 7 (B)**.

29/42

[093] Um outro aspecto importante a ser investigado, antes de usar os Carbon-Dots como carreadores de fármacos, é a estabilidade destas nanopartículas, sobretudo em solução. Por esse motivo, a fotoestabilidade desses nanomateriais sob excitação de 370 e 810 nm é avaliada e os resultados estão na **Figura 8 (A)**. É observado que por pelo menos duas horas, não há decréscimo na intensidade de luminescência dos Carbon-Dots. Isso indica que não há fotodegradação do material durante esse período.

[094] Feita essa análise inicial, são preparadas três soluções aquosas a partir dos materiais Carbon-Dots a, Carbon-Dots b e Carbon-Dots c e por análises de Carbono Orgânico Total (COT) a estabilidade do nanomaterial é avaliada ao longo de 30 dias. Ao analisar o gráfico apresentado na **Figura 8 (B)**, é notório o aumento acelerado da concentração de carbono inorgânico em solução, provavelmente devido a processos oxidativos nas superfícies do Carbon-Dots.

[095] No período entre dez e vinte dias, a formação de carbono inorgânico é desacelerada. Por essa razão, opta-se por utilizar soluções de Carbon-Dots preparadas com dez dias de antecedência para o preparo das nanoformulações contendo Anfotericina B (AnB@C-Dots).

#### **EXEMPLO 2: Preparo e caracterização da nanoformulação**

[096] Uma vez sintetizados os Carbon-Dots, uma série de soluções de Carbon-Dots e AnB em diferentes concentrações são preparadas, como descrito na **Etapa B**.

[097] A fim de avaliar se as ligações éster boronato

30/42

são formadas entre as moléculas de AnB e o Carbon-Dots, ilustradas na **Figura 9 (A)**, são obtidos e espectros de emissão sob excitação de 370 nm, conforme apresentado na **Figura 9 (B)**. A redução da intensidade de emissão com o aumento da concentração de AnB é resultante do efeito *quenching* da luminescência dos Carbon-Dots na presença de AnB e é um indicativo de que houve formação da ligação entre carreador e fármaco.

**[098]** É observado que as soluções de Carbon-Dots com AnB nas concentrações acima de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  possuem espectro idêntico ao da solução contendo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de fármaco. Além disso, nessas soluções, era visível a precipitação de AnB. Isso acontece, provavelmente, devido ao limite de solubilidade da AnB em DMSO, e não devido a esgotamento dos carreadores disponíveis em solução para ligação com o fármaco. Por esse motivo,  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  é a concentração de AnB fixada para a formulação AnB@C-Dots. Essa concentração de AnB em solução aquosa é considerada alta (VEN, H.; PAULUSSEN, C.; FEIJENS, P.; MATHEEUSSEN, A.; ROMBAUT, P.; KAYAERT, P.; MOOTER, G.; WEYENBERG, W.; COS, P.; MAES, L.; LUDWIG, A. *Journal of Controlled Release*, 161:795-803, 2012).

**[099]** Os estados de agregação da AnB é determinado por espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis. Os espectros de absorção da AnB em seu estado agregado, em água, são marcados pelos picos em 420 nm, 385 nm, 360 nm e por um pico intenso em 340 nm. (SELVAM, Susithra; MISHRA, Ashok. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 93:66-70, 2008) Por outro lado, os espectros de absorção da AnB dispersa em



## 31/42

dimetilsulfóxido (DMSO) possuem bandas em 408 nm, 385 nm e 365 nm, características de sua forma monomérica. (SELVAM, Susithra; MISHRA, Ashok. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 93:66-70, 2008).

**[100]** Os espectros de AnB em dispersões micelares, como é o caso da D-AnB, são bastante semelhantes ao de AnB dispersa em DMSO, já que essas dispersões também contêm o antimicótico na forma monomérica. (SELVAM, Susithra; MISHRA, Ashok. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 93:66-70, 2008).

**[101]** A **Figura 10** exhibe os espectros de absorção no UV-Vis da AnB@C-Dots, D-AnB, e de AnB pura dispersa em DMSO para efeitos de comparação. Ambos os espectros possuem os três picos característicos da AnB na forma monomérica (em 408 nm, 385 nm e 365 nm). O pico mais intenso, em 328 nm, no espectro de D-AnB é atribuído à AnB agregada (EGITO, Sócrates; ARAUJO, Ivonete; DAMASCENO, Bolivar; PRICE, James. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91:2354-2366, 2002). É amplamente aceito na literatura que essa banda aparece devido ao deslocamento hipsocrômico do pico, originalmente, em 340 nm (em espectros de AnB pura, em água) devido à interação do desoxicolato com os agregados de AnB, de forma a aproximar os monômeros (STOODLEY, Robin; WASAN, Kishor; BIZZOTTO, Dan. *Langmuir*, 11:8718-8725, 2007).

**[102]** No espectro da nanoformulação AnB@C-Dots um pico similar aparece, também por volta de 328 nm, porém com intensidade menor. Isso indica que a agregação da

32/42

AnB quando associada às nanopartículas de Carbon-Dots é menor, quando comparada à formulação comercial D-AnB. Deve-se considerar também a contribuição da transição  $n-n^*$  dos Carbon-Dots para esse pico, já que ele situa-se na mesma região.

**EXEMPLO 3: Atividade antifúngica da formulação AnB@C-Dots**

[103] A atividade antifúngica da formulação é testada para *Candida albicans* pela técnica de microdiluição em placa. Avaliação macroscópica do semeio da microdiluição em placa pode ser feita a partir da observação da **Figura 11**, onde são apresentadas as placas semeadas com diferentes concentrações da formulação, após 24h de incubação em estufa de crescimento a 35 °C. As concentrações analisadas são: (1) 16,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (2) 8,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (3) 4,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (4) 2,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (5) 1,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (6) 0,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (7) 0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (8) 0,13  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (9) 0,06  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e (10) 0,03  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

[104] As concentrações acima de 0,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentam inibição total de crescimento do fungo, ou seja, apresentam ação fungicida e, por isso, 0,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  é considerada a Concentração fungicida mínima. A concentração 0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , é considerada com ação fungistática, uma vez que é observado o crescimento de colônia isoladas.

[105] Os resultados obtidos de Concentração Inibitória em 50% (IC50) e Intervalo de Confiança (CI95%) são apresentados na **Tabela 2**.

33/42  
Tabela 2

TESTE	AnB@C-Dots		AnB	
	IC50 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	CI95% (IC50)	IC50 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	CI95% (IC50)
1	0,2320	0,1812 a 0,2721	0,1530	0,1236 a 0,1894
2	0,1275	0,1056 a 0,1542	0,1468	0,1120 a 0,3144
3	0,2569	0,2337 a 0,2823	0,2777	0,2378 a 0,3447
4	0,3902	0,2444 a 0,6312	0,4037	0,2341 a 0,7007

[106] Os resultados obtidos demonstram que a nanoformulação preserva a atividade antimicrobiana da AnB.

[107] Ainda, o IC95% apresentado pela AnB@C-Dots foi em torno de 0,1301 a 0,2860 enquanto que no estudo de Meunier, Lambert e Auwera (1990) foi obtido o IC95% da AnB em inóculos de *Candida albicans* entre 0,1500 a 0,3000. (MEUNIER, F.; LAMBERT, C.; AUWERA, V. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25:227-236, 1990). Dessa forma, o intervalo de confiança em 95% da AnB@C-dots é semelhante à formulação comercial testada.

**EXEMPLO 4: Teste de toxicidade da nanoformulação AnB@C-Dots em sistemas vivos**

[108] A toxicidade da nanoformulação AnB@C-Dots é avaliada em camundongos Balb/c.

[109] São usados trinta camundongos fêmeas da linhagem Balb/c compondo cinco grupos. Os animais são adquiridos com aproximadamente 30 dias e mantidos em

## 34/42

ambiente com luminosidade controlada, com ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Em cada gaiola são acondicionados 3 animais, com água *ad libitum* e ração oferecida à vontade durante todo o experimento. As gaiolas são forradas com maravalha.

[110] Com cerca de 120 dias de idade, os animais são submetidos ao esquema terapêutico por 10 dias, conforme **Tabela 3**. Ressalta-se que os medicamentos e o soro fisiológico são administrados por via intraperitoneal e os volumes administrados aos animais variam de acordo com seus pesos, de 240 a 360  $\mu\text{L}$ .

**Tabela 3**

Grupo	Tratamento	Dosagem
1	AnB@C-Dot	2 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>
2	D-AnB	2 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>
3	L-AnB	2 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>
4	Carbon-Dots	1 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>
5	Soro fisiológico 0,9% (controle negativo)	-

[111] As formulações para o tratamento são preparadas da seguinte forma:

[112] AnB@C-Dot - Uma solução de AnB@C-Dot de concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> é preparada no dia anterior ao início do esquema terapêutico, e armazenada em refrigerador, protegida da luz. A partir dessa solução, uma nova solução de concentração de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> é preparada em água para injetáveis diariamente, ao longo do ensaio *in vivo*.

[113] D-AnB e L-AnB - Uma solução com concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> é preparada em água injetável no dia anterior ao início do esquema terapêutico e mantida em

**35/42**

refrigerador, protegida da luz. A partir dessa solução concentrada, uma solução de concentração de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  é preparada em dextrose 5% diariamente, durante os dez dias de experimento.

**[114]** Carbon-Dots - Uma solução de concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de Carbon-Dots é preparada dez dias antes do início do esquema terapêutico em água para injetáveis. No dia anterior ao início do tratamento, uma nova solução, de concentração de  $0,125 \text{ mg.mL}^{-1}$ , é produzida e esta é administrada durante os dez dias.

**[115]** O soro fisiológico 0,9% é usado sem tratamento prévio.

**[116]** Após dez dias de tratamento, os animais são anestesiados por meio da aplicação de cloridrato de xilasina na dose de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , associado a quetamina na dose de  $90 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , por via intramuscular, para posterior coleta de sangue por punção intracardiaca (para realização dos testes laboratoriais). Ainda sob o efeito dos anestésicos, os animais são levados, individualmente, à câmara de saturação de  $\text{CO}_2$ , sendo esta, fechada de maneira a atingir uma saturação superior a 70%. Isso leva os animais a óbito por parada cardiorrespiratória. Os rins e fígados são extraídos para estudos de histopatologia.

**[117]** As atividades descritas no presente exemplo foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília, protocolo nº 8480/2016.

**[118]** Os dados são analisados com o auxílio de software. As amostras são consideradas independentes e a normalidade das variáveis e a homogeneidade das

## 36/42

variâncias são verificadas através dos testes de *Shapiro-Wilk* e de *Levene*, respectivamente. A comparação entre as médias dos grupos é feita através de Análise de Variância (ANOVA), sempre que os critérios de normalidade e homogeneidade são satisfeitos, seguida pelo pós-teste de *Tukey* ou de *Sheffé*, para grupos com mesmo número de indivíduos (N) e com N diferentes. Quando os critérios de normalidade e/ou homogeneidade não são atingidos, o confronto entre as medianas dos grupos é feito através do teste de *Kruskal-Wallis*. Valores de  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significantes.

**[119]** A avaliação da toxicidade da formulação AnB@C-Dots é feita através de exames bioquímicos e hematológicos e por meio da avaliação de danos causados nos tecidos de alguns órgãos, através de estudos histológicos.

**[120]** O tratamento com AnB causa efeitos colaterais aos pacientes relacionados aos danos provocados por essa droga nos rins e no fígado (BES, David; ROSANOVA, Maria; SBERNA, Norma; ARRIZURIETA, Elvira. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 33:198-206, 2014). Por esse motivo, fatores como o peso desses dois órgãos e parâmetros bioquímicos são importantes para a avaliação da toxicidade de novas formulações.

**[121]** A **Tabela 4** relaciona o percentual de massa dos rins em relação à massa corporal dos camundongos. O teste ANOVA revela que existe pelo menos um grupo cuja média de massa dos rins em relação à massa corporal possui diferença estatisticamente significativa ( $p <$

37/42

0,01) quando comparado aos demais grupos. O teste de *Scheffé* é aplicado para identificar os grupos estatisticamente diferentes e os detalhes encontram-se na **Tabela 4**. Apesar de o grupo tratado com AnB@C-Dots apresentar maior massa percentual dos rins média do que a dos grupos que receberam D-AnB e L-AnB, não existe diferença estatística entre os grupos AnB@C-Dots e o controle negativo.

**Tabela 4**

	Massa dos rins como % da massa corporal				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnBe	L-AnBe	Carbon-Dots	Controle negativo
N válido	6	4	6	5	6
Média	1,55 <sup>a</sup>	1,39 <sup>b</sup>	1,40 <sup>b</sup>	1,48 <sup>a,b</sup>	1,43 <sup>a,b</sup>
Desvio padrão	0,07	0,06	0,08	0,08	0,06
p-valor	< 0,01				

Letras diferentes indicam  $p < 0,05$ , pelo teste de *Scheffé*.

**[122]** Outro fator usado para avaliar a saúde dos rins dos animais é a dosagem de ureia. Juntamente com a creatinina, essa substância, quando encontrada em grandes quantidades no sangue pode indicar a diminuição da taxa de filtração glomerular e, conseqüentemente, insuficiência renal (BES, David; ROSANOVA, Maria; SBERNA, Norma; ARRIZURIETA, Elvira. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 33:198-206, 2014).

**[123]** A **Tabela 5** relaciona as médias de dosagem de ureia encontradas nesse experimento. O teste ANOVA mostra a existência de pelo menos um grupo estatisticamente diferente dos demais ( $p = 0,032$ ). De acordo com o teste de *Tukey*, o grupo AnB@C-Dots não é diferente estatisticamente do controle negativo. Além

38/42

disso, o grupo que recebe a nanoformulação apresenta a menor dosagem média de ureia, menor até do que a medida para o grupo tratado com L-AnB, que por sua vez apresenta diferença estatística em relação ao controle negativo. Isso mostra que a AnB@C-Dots não provoca danos no tecido renal dos animais.

**Tabela 5**

	Ureia (mg/dL)			
	Grupo			
	AnB@C-Dots	D-AnB	L-AnB	Controle negativo
N válido	3	3	3	3
Média	58 <sup>a,b</sup>	62 <sup>a,b</sup>	72 <sup>a</sup>	56 <sup>b</sup>
Desvio padrão	8	5	7	3
p-valor	0,032			

Letras diferentes indicam  $p < 0,05$ , pelo teste de Tukey.

[124] Os valores relacionados à porcentagem de massa do fígado em relação à massa corporal dos camundongos estão organizados na **Tabela 6**. Novamente, o teste ANOVA permite a detecção de ao menos um grupo com massa percentual do fígado média estatisticamente diferente dos demais ( $p = 0,011$ ). O teste de *Scheffé* aponta que não existe diferença estatística entre os grupos AnB@C-Dots e controle negativo.

**Tabela 6**

	Massa do fígado como % da massa corporal				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnB	L-AnB	Carbon-Dots	Controle negativo
N válido	6	5	6	5	6
Média	5,73 <sup>a</sup>	5,07 <sub>a,b</sub>	5,13 <sub>a,b</sub>	5,15 <sup>a,b</sup>	5,21 <sup>a,b</sup>
Desvio padrão	0,25	0,55	0,48	0,25	0,44
p-valor	0,011				

Letras diferentes indicam  $p < 0,05$ , pelo teste de *Scheffé*.



39/42

[125] Parâmetros bioquímicos são usados para averiguar alterações nas funções hepáticas dos animais. As quantidades de albumina e bilirrubinas no soro sanguíneo são dois importantes marcadores usados para avaliar a saúde do fígado (GIANNINI, Edoardo; TESTA, Roberto; SAVARINO, Vincenzo. *Canadian Medical Association Journal*, 172:367-379, 2005). Baixos índices de albumina podem estar associados a problemas hepáticos e até mesmo a renais (DOUMAS, Basil; PETERS, Theodore. *Clinica Chimica Acta.*, 258:3-20, 1997), já altos níveis de bilirrubinas podem ser sinal de danos no fígado causados por drogas (GIANNINI, Edoardo; TESTA, Roberto; SAVARINO, Vincenzo. *Canadian Medical Association Journal*, 172:367-379, 2005).

[126] Os animais dos diferentes grupos apresentam medianas iguais estatisticamente para esses dois marcadores, segundo o teste de *Kruskal-Wallis*, conforme detalham as **Tabelas 7 e 8**.

**Tabela 7**

	Albumina (g/dL)				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnB	L-AnB	Carbon-Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Mediana	2,6	2,8	2,6	2,9	2,7
Intervalo	0,2	0,6	0,2	0,1	0,2
p-valor	335				

**Tabela 8**

	Bilirrubinas totais (mg/dL)				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnB	L-AnB	Carbon-Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Mediana	0,06	0,03	0,03	0,04	0,03
Intervalo	0,16	0,00	0,00	0,01	0,37
p-valor	96				

## 40/42

[127] A transaminase piruvica (TGP), juntamente com a transaminase oxalacética (TGO), é uma enzima que exerce papel essencial no ciclo do ácido cítrico, ainda que indiretamente. Nas células hepáticas, essa enzima situa-se no citoplasma. Por isso altos níveis de TGP no plasma sanguíneo são indicativo de dano nas células do fígado. Já a TGO é encontrada tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias das células do fígado e sua presença em grandes quantidades no sangue também indica disfunção hepática (GIANNINI, Edoardo; TESTA, Roberto; SAVARINO, Vincenzo. *Canadian Medical Association Journal*, 172:367-379, 2005).

[128] O teste ANOVA é usado para comparar as dosagens de TGP e TGO médias obtidas para os grupos e permite a conclusão de que não existe diferença estatística entre essas médias (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9

	Transaminase piruvica (TGP) (UI/L)				
	Grupo				
	AnB@C- Dots	D-AnB	L-AnB	Carbon -Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Média	32	31	31	23	24
Desvio padrão	12	8	5	4	3
p-valor	0,366				

Tabela 10

	Transaminase oxalacética (TGO) (UI/L)				
	Grupo				
	AnB@C- Dots	D-AnB	L-AnB	Carbon -Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Média	229	134	190	75	105
Desvio padrão	100	46	97	17	33
p-valor	0,102				

41/42

[129] O último parâmetro bioquímico considerado foi a dosagem de fosfatase alcalina e os resultados estão resumidos na **Tabela 11**. Essa enzima é responsável pelo transporte de metabólitos através das membranas celulares. A elevação da quantidade dessa enzima no sangue também é indicativo de problemas hepáticos, frequentemente causados pelo uso de drogas (GIANNINI, Edoardo; TESTA, Roberto; SAVARINO, Vincenzo. *Canadian Medical Association Journal*, 172:367-379, 2005).

**Tabela 11**

	Fosfatase alcalina (U/L)				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnB	L-AnB	Carbon-Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Mediana	48 <sup>a</sup>	76 <sup>a,b</sup>	93 <sup>a,b</sup>	94 <sup>b</sup>	89 <sup>a,b</sup>
Intervalo	15	16	22	1	34
p-valor	34				

Letras diferentes indicam  $p < 0,05$

[130] A hipótese de que as medianas obtidas para os diferentes grupos de camundongos são iguais é descartada através do teste de *Kruskal-Wallis*. Existe diferença estatística entre os grupos tratados com AnB@C-Dots e C-Dots, embora nenhum desses grupos tenha diferença estatística do grupo controle negativo no nível de significância considerado. Isso mostra que os danos nos fígados dos animais causados pela AnB@C-Dots são menos significativos do que o das outras duas formulações (D-AnB e L-AnB).

[131] Sabe-se que a AnB tem efeito hemolítico (LUDWIG, Daniel; DE CAMARGO, Luciana; KHALIL, Najeh; AULER, Marcos; MAINARDES, Rubiana. *Mycopathologia*,

42/42

183:1-10, 2018), por isso os hemogramas de alguns dos animais também são realizados e analisados. ANOVA revela que não existe diferença estatística no nível de significância considerado entre os grupos tratados com AnB@C-Dots e L-AnB, que é uma formulação na qual a toxicidade da AnB às hemácias é amenizada ( $p = 0,719$ ) (VEN, H.; PAULUSSEN, C.; FEIJENS, P.; MATHEEUSSEN, A.; ROMBAUT, P.; KAYAERT, P.; MOOTER, G. *Journal of Controlled Release*, 161:795-803, 2012). Além disso, também não há diferença entre o grupo que recebe a nanoformulação e o controle, que não recebe o fármaco. A **Tabela 12** resume esses resultados.

**Tabela 12**

	Hemácias (milhões.mm <sup>-3</sup> )		
	Grupo		
	AnB@C-Dots	L-AnB	Controle negativo
N válido	3	3	3
Média	6,05	6,86	7,61
Desvio padrão	1,56	2,09	2,13
p-valor	0,719		

**[132]** Nenhum dos tratamentos utilizados, inclusive o da AnB@C-Dots produz danos visíveis nos estudos de histologia. A **Figura 12** contém imagens dos fígados de animais dos grupos que receberam AnB@C-Dots, D-AnB e L-AnB, comparados aos animais do grupo controle. Já **Figura 13** reúne imagens adquiridas dos rins dos animais dos mesmos grupos. Os tecidos apresentaram morfologia normal.

**[133]** Os exames bioquímicos e as análises histológicas mostram que a AnB@C-Dots não produz danos significativos aos tecidos dos rins e do fígado dos camundongos.