



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*LEISHMANIA* DE INH-2 EM NANOPARTÍCULAS
NO TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS POR
*LEISHMANIA INFANTUM***

DIANA ANGÉLICA DOS SANTOS DANTAS

Salvador – Bahia

2020

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*LEISHMANIA* DE INH-2 EM NANOPARTÍCULAS
NO TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS POR
*LEISHMANIA INFANTUM***

DIANA ANGÉLICA DOS SANTOS DANTAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestra.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Salvador - Bahia

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C957a Dantas, Diana Angélica dos Santos.

Avaliação do efeito anti-*Leishmania* de INH-2 em nanopartículas no tratamento de macrófagos murinos infectados por *Leishmania infantum*/ Diana Angélica dos Santos Dantas. _ Salvador, 2020.

62 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

1. Nanopartículas. 2. Leishmania. 3. Tratamento. 4. Infecção. I. Título.

CDU 616.993.161

“AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*LEISHMANIA* DE INH-2 EM NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA INFANTUM*”.

DIANA ANGÉLICA DOS SANTOS DANTAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 17 de dezembro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Jaime Ribeiro Filho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

DocuSigned by:
Vinicius Pinto Costa
58D7880B1342430...

Dr. Vinicius Pinto Costa Rocha
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda força que me foi dada para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu pai, por todo incentivo na minha carreira acadêmica, paciência, opiniões cedidas durante treinos de apresentações, leituras de relatórios, qualificação e dissertação, por nunca ter me deixado desistir. A minha mãe, por toda paciência para ouvir meus desabafos, conselhos e incentivo.

Ao Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento da pesquisa, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho e pela estrutura oferecida.

À Dra. Patrícia Veras, pela oportunidade, aprendizado, incentivo e injeções constantes de animo;

À Kercia Pinheiro, por toda parceria durante todo o mestrado, ajuda na realização de experimentos, compartilhamento de aprendizado, e escrita da dissertação.

A todos os amigos e colegas do eterno LPBI, atualmente, LaIPHE, pela amizade, companherismo, aprendizados e por tornar essa jornada muito mais leve nos diversos momentos de descontração e convivência diária no laboratório, vocês foram fundamentais!

À Dr. Fábio Formiga e mestre Vinicius Pires, bem como colegas e pesquisadores de outros laboratórios, por toda contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários do SENAI/CIMATEC, pela disponibilidade do uso dos equipamentos para desenvolvimento de experimentos.

A toda equipe do Laboratório de Micro e Nanotecnologia, de Farmanguinhos (Fiocruz-RJ), pela parceria, recepção no seu laboratório, aprendizado e ajuda para o desenvolvimento de grande parte desse trabalho.

À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna, do Instituto Gonçalo Moniz, pelo acervo e estrutura disponibilizados.

Aos meus pais, Arlindo e Angélica, pelo amor incondicional e incentivo
diário.

Amo vocês.

DANTAS, Diana Angélica dos Santos Dantas. **Efeito anti-*Leishmania* do INH-2 em nanopartículas no tratamento de macrófagos murinos infectados por *Leishmania infantum***. 2022. 62 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Parasitos do gênero *Leishmania* são causadores da zoonose conhecida como leishmaniose. Muitos fármacos têm sido usados no tratamento da leishmaniose, no entanto, em razão dos efeitos colaterais graves e aparecimento de falha no tratamento, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença. Na nossa equipe, foi demonstrada a eficácia do composto 17-AAG como um agente leishmanicida, porém apresenta limitações na sua utilização. Para contornar essa dificuldade, decidimos avaliar o seu análogo INH-2 que apresenta melhores propriedades farmacocinéticas e já mostrou ser eficaz em reduzir significativamente o tamanho da lesão de camundongos, porém, pouco se sabe da sua atividade em modelo de leishmaniose visceral causado pela *L. infantum*. Além disso, sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos podem melhorar a eficácia do tratamento, pois liberam o ativo de forma controlada diminuindo seus efeitos colaterais. **OBJETIVO:** Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial leishmanicida do INH-2 em modelo *in vitro* no tratamento de macrófagos murinos infectados com *L. infantum*. **MATERIAL E MÉTODO:** Foi realizada a padronização do protocolo de encapsulamento do INH-2 em nanopartículas, posteriormente, a caracterização das nanopartículas produzidas e avaliamos a sua eficácia em relação a viabilidade celular de macrófagos murinos e viabilidade intracelular em parasitos de *L. infantum*, comparando com o composto não encapsulado. **RESULTADOS:** Inicialmente, as nanopartículas produzidas utilizando o polímero PCL pelo método de nanoprecipitação, apresentaram boas caracterizações em relação ao tamanho, PDI e potencial zeta, porém, devido a sua baixa eficiência de encapsulamento (%EE), foi necessária a produção de novos protocolos pelo método de emulsão múltipla e simples, que, após algumas repetições, conseguimos obter uma %EE de 100%. Adicionalmente, mostramos que o INH-2 livre é 6 vezes mais tóxico para as células hospedeiras do que quando se encontra incorporado a nanopartículas, com um CC_{50} de 3,2057 μ M para o composto livre e 20,13 μ M para o composto encapsulado. De forma similar, o IC_{50} , nos tempos de 48 e 72 horas de tratamento foram, respectivamente, de 0,2766 nM e 0,3062 nM. Para o composto encapsulado, o valor encontrado foi de 17,54 nM no tempo de 48 horas de tratamento. **CONCLUSÃO:** Em conjunto, nossos resultados mostram que há uma grande vantagem do encapsulamento do INH-2 em nanopartículas poliméricas, visto que, a sua utilização reduziu a toxicidade do composto para as células hospedeiras *in vitro*. Apesar do encapsulamento com a formulação a base de PLGA ter resultado de IC_{50} muito superior ao do composto livre, o índice de seletividade (IS) mostrou valores suficientemente elevados (SI = 1000) para testes futuros *in vivo*. Esses dados indicam que as formulações produzidas são promissoras, apesar de ser necessário realizarmos estudos adicionais para aperfeiçoar os métodos de encapsulamento utilizados na produção das nanopartículas poliméricas, além de ensaios para avaliar a eficácia do INH-2 encapsulado comparado ao composto livre *in vivo*.

Palavras-chave: Nanopartículas. INH-2. *Leishmania*. Infecção. Tratamento.

DANTAS, Diana Angélica dos Santos. **Evaluation of the anti-*Leishmania* effect of INH-2 in nanoparticles in the treatment of murine macrophages infected with *Leishmania infantum***. 2022. 62 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Leishmania* parasites are the cause of zoonanthroponosis known as leishmaniasis. Many drugs have been used in the treatment of leishmaniasis, however, due to the serious side effects and the appearance of treatment failure, it is necessary to develop new drugs to treat the disease. In our team, the efficacy of 17-AAG as a leishmanicidal agent was demonstrated, but it has limitations in its use. To overcome this difficulty, we decided to evaluate its INH-2 analogue, which has better pharmacokinetic properties and has already shown to be effective in significantly reducing the size of the lesion in mice, however, little is known about its activity in a visceral leishmaniasis model caused by *L. infantum*. In addition, nanostructured drug delivery systems can improve treatment efficacy, as they release the asset in a controlled manner, reducing its side effects. **OBJECTIVE:** This study aimed to evaluate the leishmanicidal potential of INH-2 in an *in vitro* model in the treatment of murine macrophages infected with *L. infantum*. **MATERIAL AND METHOD:** The standardization of the INH-2 encapsulation protocol in nanoparticles was performed, afterwards the characterization of the produced nanoparticles and we evaluated their effectiveness in relation to the cellular viability of murine macrophages and intracellular viability in *L. infantum* parasites, comparing with the non-encapsulated compound. **RESULTS:** Initially, the nanoparticles produced using the PCL polymer by the nanoprecipitation method, presented good characterizations in relation to size, PDI and zeta potential, however, due to their low encapsulation efficiency (% EE), it was necessary to produce new protocols by the method of multiple and simple emulsion, that after a few repetitions, we managed to obtain a %EE of 100%. In addition, we have shown that free INH-2 is 6 times more toxic to host cells than when incorporated into nanoparticles, with a CC50 of 3.2057 μM for the free compound and 20.13 μM for the encapsulated compound. Similarly, the IC50, at 48 and 72 hours of treatment, were 0.2766 nM and 0.3062 nM, respectively. For the encapsulated compound, the value found was 17.54 nM within 48 hours of treatment. **CONCLUSION:** Together, our results show that there is a great advantage of encapsulating INH-2 in polymeric nanoparticles, since it has reduced the toxicity of the compound to host cells *in vitro*. Although encapsulation with the nanoparticles based on PLGA resulted in IC₅₀ value much higher than that of the free compound, the SI values high enough (SI = 1000) to carry out in the future tests *in vivo*. These data indicate that the produced formulations are promising, although it is necessary to carry out additional tests to improve the encapsulation methods used for the production of polymeric nanoparticles, as well as assays to evaluate the efficacy of encapsulated INH-2 compared to the free compound *in vivo*.

Keywords. Nanoparticles. INH-2. *Leishmania*. Infection. Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama esquemático do ciclo de vida digenético da <i>Leishmania</i>	21
Figura 2	Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	40
Figura 3	Cromatograma das soluções de INH-2, obtido por HPLC.....	41
Figura 4	Curva de concentração do INH-2 por HPLC.....	41
Figura 5	Diagrama descritivo dos novos protocolos testados.....	43
Figura 6	Curva padrão para quantificação das nanoformulações contendo INH-2...45	
Figura 7	Aspecto visual das soluções contendo nanofomulações produzidas pelo método de emulsão simples.....	46
Figura 8	Aspecto visual da solução contendo nanoformulação, método de emulsão dupla.....	47
Figura 9	Comparação das soluções contendo as nanoparticulas preparadas pelos métodos de emulsão simples e dupla.....	48
Figura 10	Viabilidade celular de macrófagos murinos após o tratamento com INH-2	49
Figura 11	Determinação da eficácia de INH-2 contra amastigotas de <i>L. Infantum</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulação das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação a partir de polímeros pré-formados.....	32
Tabela 2	Formulação das nanopartículas pelo método de emulsão dupla por extração do solvente.....	33
Tabela 3	Caracterização por DLS de nanopartículas preparadas por nanoprecipitação	39
Tabela 4	Quantificação da %EE em diferentes estágios do protocolo para preparo de nanoformulação pelo método de nanoprecipitação.....	42
Tabela 5	Determinação da %EE em nanoformulações produzidas utilizando variações nos insumos dos protocolos de emulsão dupla e emulsão simples.....	43
Tabela 6	Avaliação da reprodutibilidade da %EE do INH-2 em nanoformulação preparada por emulsão simples.....	44
Tabela 7	Caracterização das nanoformulações utilizando o método de emulsão simples, quanto ao tamanho, PDI e %EE.....	45
Tabela 8	Comparação das nanoformulações preparadas pelos métodos de emulsão simples e dupla quanto às características de %EE, tamanho e PDI.....	46
Tabela 9	Caracterizações de nanopartículas contendo diferentes massas de INH-2, produzida por emulsão dupla.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INH-2	Sigla utilizada para garantir sigilo de patente
17-AAG	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BMMΦ	Macrófagos derivados de medula óssea
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CO₂	Gás carbônico
L929	Célula de linhagem fibroblástica
OMS	Organização mundial da Saúde
RPMI 1640	Meio de cultura celular do Roswell Park Memorial Institute
IL	Interleucina
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
NO	Óxido Nítrico
O₂^{·-}	Superóxido
Anf B	Anforterina B
AmBisome	Anfortericina B encapsulada em lipossomas
AnfB-NTCf	Anfotericina B associada a nanotubulos de carbono
PLA	Biopolímero ácido poliláctico
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PCL	Policaprolactona
HOMEM	Meio mínimo essencial modificado hemoflagelado médio
SBF	Soro bovino fetal
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico
PBS	Tampão Fosfato Salina
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
PEG	Polietilenoglicol
PVA	Álcool polivinílico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CaCl₂	Cloreto de cálcio

IFN-γ	Interferon-gama
PDI	Índice de polidispersão
DLS	Técnica de espalhamento de luz dinâmico
%EE	Eficiência de encapsulamento
IS	Índice de seletividade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	HIPÓTESE	18
2.1	OBJETIVOS	18
2.1.1	Geral	18
2.1.2	Específicos	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	LEISHMANIOSE: EPIDEMIOLOGIA E AGENTE ETIOLÓGICO	19
3.2	INTERAÇÃO <i>LEISHMANIA</i> X CÉLULA HOSPEDEIRA	20
3.3	LEISHMANIOSE VISCERAL	22
3.4	TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	23
3.5	PROTEÍNA DO CHOQUE TÉRMICO 90 (HSP90)	25
3.6	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	ANIMAIS	30
4.2	PARASITOS	30
4.3	OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS	30
4.4	PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ENCAPSULAMENTO DO INH-2 EM NANOPARTÍCULAS	31
4.4.1	Método nanoprecipitação a partir de polímeros pré-formados	31
4.4.2	Método de emulsão dupla por extração de solvente (Salvador et al.2015, com modificações)	32
4.4.3	Método de precipitação/evaporação da solvente emulsão simples (Barrichello et al, 1999 com adaptações)	33
4.4.4	Quantificação da eficiência de encapsulamento das nanoformulações (EE%)	34
4.4.5	Caracterização físico-química das nanopartículas	34
4.5	Avaliação da viabilidade de macrófagos murinos após o tratamento com INH-2	34
4.6	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> COM17- DMAG	35
4.7	AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE <i>LEISHMANIA</i> APÓS	35

	TRATAMENTO COM INH-2	
4.8	DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO), CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E QUIMIOCIAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. INFANTUM</i>	36
5	PROPOSTA DE ANÁLISE	37
6	RESULTADOS	38
6.1	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFORMULAÇÕES PRODUZIDAS UTILIZANDO PROTOCOLO DE NANOPRECIPITAÇÃO	38
6.2	QUANTIFICAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES PRODUZIDAS UTILIZANDO PROTOCOLO DE NANOPRECIPITAÇÃO	39
6.3	PRODUÇÃO DE NANOFORMULAÇÕES UTILIZANDO PROTOCOLOS DE EMULSÃO SIMPLES E EMULSÃO DUPLA	41
6.4	ESTABELECIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO INH-2 EM NANOFORMULAÇÕES	44
6.5	PREPARO DE NANOFORMULAÇÃO UTILIZANDO O MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES	45
6.6	PREPARAÇÃO DE NANOFORMULAÇÃO PELO MÉTODO DE EMULSÃO DUPLA	46
6.7	EFEITO TÓXICO DO INH-2 SOBRE MACRÓFAGOS	49
6.8	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> COM INH-2	49
7	DISCUSSÃO	52
8	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Parasitas do gênero *Leishmania* são causadores da zoonose conhecida como leishmanioses que integram o grupo de doenças infecciosas negligenciadas de transmissão vetorial. Elas ocorrem nos países mais pobres e atingem as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde. Apresentam uma ampla distribuição global, no entanto a maioria dos casos ocorrem na África, Ásia e Américas (OMS, 2019).

As leishmanioses estão presentes em 18 países das Américas e a forma clínica mais frequente é a leishmaniose cutânea (LC), enquanto que, a leishmaniose visceral (LV) é a forma mais severa, podendo ser fatal, se não tratada. Além disso, a leishmaniose mucosa/cutâneo-mucosa (LCM) possui uma evolução crônica podendo causar deformidades e sequelas (OMS, 2019).

Atualmente, o tratamento da infecção ainda é feito por meio de intervenção quimioterápica. Medicamentos como antimoniais pentavalentes têm sido recomendados e usados no tratamento da leishmaniose em humanos nos últimos anos. No entanto, seu uso está associado a graves efeitos colaterais e longos ciclos de tratamento, que leva a interrupções no tratamento, favorecendo falência terapêutica. Em países como a Índia, foram relatados casos de resistência (SUNDAR, 2001; SUNDAR et al., 2000; CHAPPUIS et al., 2007, CROFT; COOMBS, 2003). A anfotericina B associada a lipossomos (AmBisome) é a nanoformulação que causa menos efeitos colaterais, tendo se mostrado mais eficaz, em comparação ao fármaco não encapsulado. No entanto, o alto custo limita o seu uso em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (CHAPPUIS et al., 2007). Com base nesses dados, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da leishmaniose.

Inibidores da proteína de choque térmico 90 (Hsp90) vêm sendo amplamente estudados graças ao seu efeito antiparasitário, devido ao seu papel no controle do ciclo celular, na adaptação em situações de estresse, virulência do parasito (HOMBACH; CLOS, 2014).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o 17-AAG, um inibidor da Hsp90, tem um alto efeito anti-*Leishmania* *in vitro* e *in vivo*, sendo capaz de reduzir o percentual de infecção de macrófagos infectados por *L. amazonensis* de forma tempo e dose dependentes (PETERSEN et al., 2012). De maneira similar, o 17-AAG mostrou-se eficaz na diminuição do tamanho da lesão provocada por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c infectados na orelha e também reduziu a carga parasitária no sítio da lesão (SANTOS et al., 2014).

Apesar de apresentar alta eficácia, o 17-AAG tem solubilidade aquosa baixa,

biodisponibilidade baixa e causa hepatotoxicidade, sendo necessária a incorporação de novas estratégias, utilizando seus derivados menos tóxicos, além de formulações baseadas em sistemas de liberação de fármacos de forma controlada e direcionada (CHANDRAN et al., 2010).

Por isso, decidimos avaliar o potencial terapêutico do análogo do 17-AAG, INH-2, que também apresenta atividade inibidora sobre a Hsp90, além de melhores propriedades farmacocinéticas e solubilidade em água (EGORIN et al. 2002). Estudos recentes realizados pela equipe mostraram que o tratamento com INH-2 em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*, foi capaz de reduzir significativamente o tamanho da lesão em relação ao controle não tratado e também foi observada uma redução drástica da carga parasitária em animais tratados. Porém, pouco se sabe da atividade leishmanicida do INH-2 em modelo de LV causado pela *L. infantum*.

Sendo assim, o presente trabalho visa testar a eficácia do INH-2 como composto anti-*Leishmania* em modelo murino de LV causada por *L. infantum*, comparando sua formulação convencional com aquela em nanopartículas de liberação controlada.

2 HIPÓTESE

O encapsulamento do INH-2 em nanopartículas potencializa seu efeito leishmanicida e reduz sua toxicidade

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Geral

Avaliar o potencial leishmanicida do INH-2 em modelo *in vitro* no tratamento de macrófagos murinos infectados com *Leishmania infantum*.

2.1.2 Específicos

- Produzir e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo INH-2;
- Avaliar a toxicidade do tratamento com INH-2 encapsulado comparado ao INH-2 em formulação livre sobre macrófagos murinos;
- Determinar a eficácia do tratamento com INH-2 encapsulado comparado ao INH-2 em formulação livre sobre parasitos intracelulares de *L. infantum*;
- Determinar o efeito do tratamento com INH-2 sobre a modulação da resposta imuno-inflamatória de macrófagos infectados por *L. infantum*;
- Avaliar o efeito do tratamento com INH-2 sobre a ultraestrutura de *L. infantum* intracelular;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LEISHMANIOSE: EPIDEMIOLOGIA E AGENTE ETIOLÓGICO

As leishmanioses são doenças de transmissão vetorial e integram o grupo de doenças infecciosas negligenciadas, uma vez que ocorrem nos países mais pobres e atingem as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde. Apresentam uma ampla distribuição global e a maioria dos casos ocorrem na África, Ásia e Américas (OMS, 2019).

A maioria dos casos de leishmaniose acontecem em países em desenvolvimento, caracterizando-se em um grave problema de saúde pública e econômico, pois impedem as pessoas afetadas de trabalharem e realizarem suas atividades diárias normalmente, interferindo assim na produtividade e bem-estar dessa população. Uma avaliação minuciosa do custo financeiro da leishmaniose para os pacientes deve levar em conta os seguintes elementos: consultas, testes biológicos, tratamento, hospitalização, suspensão de trabalho e indisponibilidade de serviço (DESJEUX, 2004). As leishmanioses possuem um grande espectro de manifestações clínicas tanto em humanos quanto em outros hospedeiros mamíferos. Suas características variam amplamente, dependendo das diferentes espécies de parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. A doença pode dividir-se em três formas clínicas distintas, sendo elas: LC, que no Brasil são principalmente causadas por *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, caracterizada por lesões ulcerativas, bordas elevadas e fundo plano em áreas mais expostas do corpo e que tende a curar espontaneamente ou pode apresentar curso indolente; LCM, cujas lesões podem aparecer em sítios de mucosa (nasal, palato e lábio superior), a partir ou não de uma lesão cutânea primária e difusa, caracterizada por pápulas, nódulos e infiltrações que tendem a se espalhar por todo corpo (BARRAL et al., 1995; GEORGIADOU; MAKARITSIS). Além dessas, são descritas em áreas endêmicas as formas cutânea disseminada e cutânea difusa, que possuem múltiplas lesões, que apresentam diferenças clínicas, histopatológicas e imunológicas. A LC difusa, é causada pela *L. amazonensis* e se manifesta sob a forma de nódulos sem comprometimento de mucosa nasal. Os pacientes não apresentam resposta imune celular contra antígenos do parasito, tendo, portanto, negatividade ao teste de intradermoreação com antígeno de *Leishmania*. O achado histopatológico é caracterizado por um infiltrado de macrófagos repletos de parasito. Por outro lado, os pacientes com LC disseminada apresentam lesões acneiformes que, posteriormente, podem ulcerar além de comprometimento de mucosa (CARVALHO, et al,

2007). Os achados histopatológicos mostram presença de infiltrado eosinofílico e/ou linfoplasmocitário e parasitos nas lesões. A forma visceral da leishmaniose, que é o foco principal do nosso trabalho, é causada pela *L. donovani* no Iran, Peru, Síria e Arábia Saudita, enquanto que na Europa e no Brasil é causada por *L. infantum* (BARRAL et al., 1995; DESJEUX, 2004; GEORGIADOU; MAKARITSIS; DALEKOS, 2015; KONIORDOU et al., 2017). Esta doença acomete principalmente órgãos internos como fígado, baço e medula óssea, e possui manifestações clínicas clássicas como: febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia grave, hipergamaglobulinemia, pancitopenia, caquexia, podendo ser fatal se não tratada (MARCONDES et al., 2013; CARVALHO; TEIXEIRA et al., 1981; CARVALHO; BADARO et al., 1985).

A LV está presente em 98 países com registros de casos, 50 desses possuem casos de leishmaniose visceral canina (LVC), sendo o cão considerado o principal reservatório urbano desse parasita. O desmatamento parece ser determinante do aumento do número de casos da doença visceral, pois reduz a disponibilidade da fonte alimentar natural para os flebotomíneos, expondo o cão doméstico e o homem, que passam a ser fontes alimentares mais acessíveis aos vetores. Além disso, o intenso processo migratório provoca o deslocamento de pessoas que levam seus animais domésticos, muitas vezes infectados, o que também contribui para a expansão e urbanização da doença (OMS, 2006, BEVILACQUA et al., 2001; MARZOCHI et al., 1985; SHERLOCK, 1996; CAMARGO-NEVES et al., 2001; ALVAR, et al., 2004).

3.2 INTERAÇÃO *LEISHMANIA* X CÉLULA HOSPEDEIRA

Protozoários do gênero *Leishmania* podem apresentar-se nas formas de promastigota e amastigota, sendo a promastigota metacíclica a forma infectante do parasito, que é inoculada na derme do hospedeiro vertebrado pela picada da fêmea do inseto vetor flebotomíneo. A transmissão da doença para o homem ocorre por meio da picada do inseto vetor pertencente ao gênero *Phlebotomus* no velho mundo, e *Lutzomyia* no novo mundo (FAYE et al., 2007). No Brasil, o principal vetor da LV é a *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ; NEIVA, 1912), contudo, outras espécies já foram incriminadas como vetores da doença em algumas regiões do país (OMS, 2006; PITA-PEREIRA et al., 2008).

As promastigotas interagem com o macrófago, ativando mecanismos de fagocitose sendo, assim, internalizadas e encontradas no interior de estruturas membranosas chamadas de vacúolos parasitóforos (Fig. 1A) (ANTOINE et al., 1998; COURRET et al., 2002). No

interior dos vacúolos, as promastigotas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas, e, uma vez diferenciadas, as amastigotas se replicam sendo capazes de escapar do sistema imune do hospedeiro (Fig. 1B e C) (ALEXANDER et al., 1999; ANTOINE et al., 1998; COURRET et al., 2002). O ciclo do parasito fecha-se quando o inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado e acaba ingerindo amastigotas, que se transformam nas formas promastigotas no interior do trato digestório dos vetores flebotomíneos (Fig. 1D, E e F) (KILLICK – KENDRICK et al, 1991).

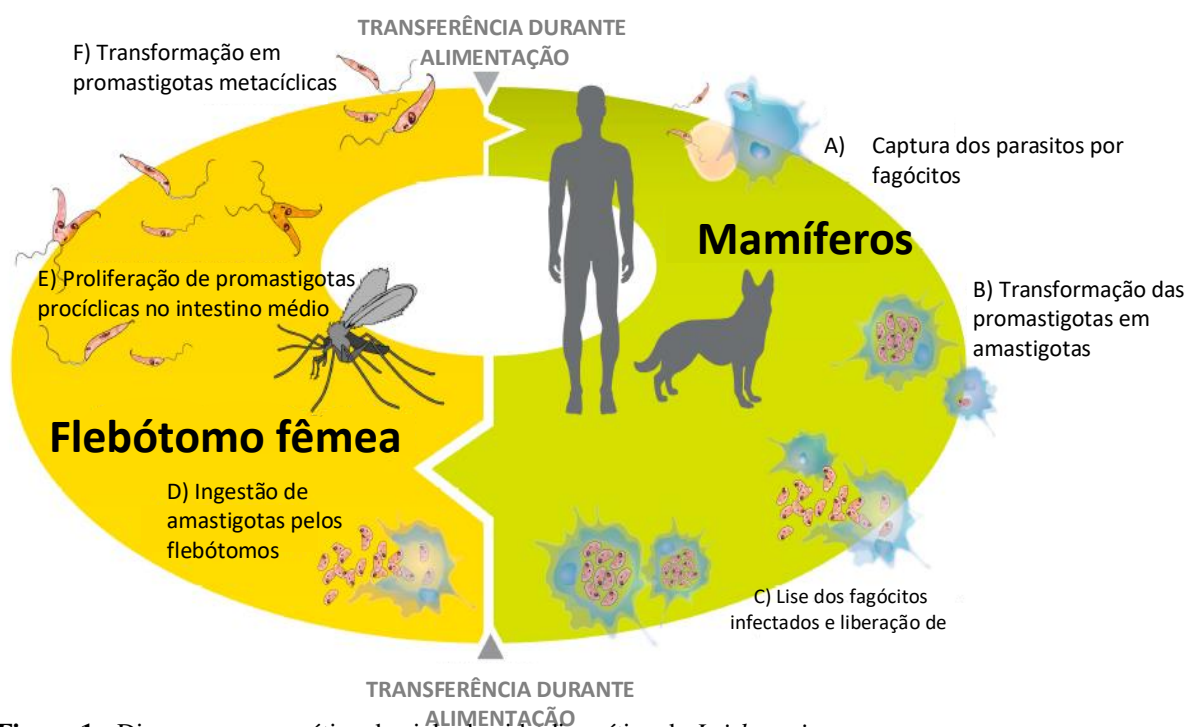


Figura 1 - Diagrama esquemático do ciclo de vida digenético da *Leishmania*
Fonte: (adaptado de VERAS; BEZERRA DE MENEZES, 2016)

O perfil imunológico do hospedeiro influencia fortemente a resposta à infecção. Em modelos murinos a resistência ou susceptibilidade às diferentes espécies de *Leishmania* depende da interação de uma série de fatores como *background* genético do parasito, do hospedeiro e o perfil da resposta imunológica induzida pela infecção (AFONSO; SCOTT 1993; DEKREY et al., 1998; GUEVARA-MENDOZA et al., 1997). Nesse contexto, macrófagos tem um papel central na infecção por *Leishmania*, atuando nas fases indutora e efetora da resposta imune. Além de abrigarem os parasitos, apresentam antígenos para linfócitos T específicos e liberam citocinas relacionadas a uma resposta protetora como a IL-12 e TNF- α , assim como citocinas relacionadas com a resposta moduladora como a IL-10 e TGF- β (BARRAL-NETTO et al., 1992; WANG et al., 1994). O curso da infecção depende principalmente da capacidade dos macrófagos em eliminar os parasitos intracelulares, assim,

estudos que busquem uma melhor compreensão da interação parasito *vs* célula hospedeira em modelos animais e/ou humanos pode fornecer dados para o desenho apropriado de novos tratamentos e intervenções imunoterapêuticas (KAYE; SCOTT, 2011; DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; MENEZES et al., 2015).

3.3 LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é uma doença sistêmica grave que se não diagnosticada e tratada pode ser fatal. Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países e no período de 2001-2017 foram registrados 59.769 casos novos, resultando em uma média de 3.516 casos por ano. Cerca de 96% (57.582) dos casos foram reportados pelo Brasil. Outros países Sul Americanos como Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela também possuem registros de casos (OMS, 2019). Ao longo dos anos, no Brasil, a letalidade da LV vem aumentando gradativamente, passando de 3,6% em 1994 para 6,7% em 2003, atingindo o percentual de 8,4% em 2004 (BARBOSA et al., 2013). A transmissão dessa forma clínica da leishmaniose tem sido amplamente descrita nos municípios do Nordeste do Brasil, indicando ser esta a principal área endêmica do país, nos últimos 30 anos (OMS, 2019).

Os principais órgãos afetados são fígado e baço, com os pacientes apresentando como manifestações clássicas: febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia grave, hipergamaglobulinemia, pancitopenia e caquexia, além de apresentar ausência de uma resposta imune celular específica contra o parasita (CARVALHO; TEIXEIRA et al., 1981, CARVALHO; BADARO et al., 1985). A evolução das manifestações clínicas da LV, são bastante variadas, onde o indivíduo pode apresentar cura espontânea, formas oligossintomáticas e assintomáticas, até manifestações graves, alcançando taxas de letalidade entre 10% e 98% (BARBOSA et al., 2013).

Acredita-se que o aumento do número de casos da LV, em áreas onde antes não havia registros, e a reemergência em áreas endêmicas estejam associados a diversos fatores, entre eles: modificações no meio ambiente, à migração, a urbanização desordenada, pobreza, desnutrição e, principalmente, fatores de riscos individuais, como a expansão da epidemia da AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida). Dentre esses fatores, destaca-se a infecção pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), que se tornou um fenômeno global de grande magnitude e extensão, atualmente caracterizado pela disseminação em centros urbanos menores e entre as mulheres, e em indivíduos de menor status socioeconômico. Segundo Barbosa e colaboradores, mais de 30 milhões de pessoas em diversas regiões do mundo

estejam infectadas com o HIV e que, pelo menos, um terço desta população viva em áreas endêmicas para a LV. Desde a década de 1980, a LV é reconhecida como uma infecção oportunista associada a estados de imunossupressão, particularmente à infecção pelo HIV (BARBOSA et al., 2013).

Dados da Organização Mundial da Saúde demonstram que, em 2017, 7.97% (338) dos casos no mundo apresentaram coinfeção LV/HIV, o que representa uma diminuição do percentual de casos quando comparado a 2016 (10,13%). Dos 338 casos reportados, 322 (95.3%) ocorreram no Brasil, 13 (3.85%) casos no Paraguai, 2 (0,59%) na Argentina e 1 (0.3%) na Colômbia. Apesar do Brasil apresentar o maior número de casos de LV, foi reportado no Paraguai a maior proporção de casos de coinfeção LV/HIV (38,23%), seguido da Argentina (22,22%) e Brasil (7,82%) (OMS, 2019). Mesmo com esse pequeno número de casos, ainda há uma grande necessidade de mais estudos que abordem a caracterização clínica e epidemiológica dessa endemia, pois ela subsidia políticas públicas de saúde no âmbito do desenvolvimento de estratégias de prevenção, bem como a definição das bases para a assistência médica prestada aos pacientes infectados (BARBOSA et al., 2013).

Essa pandemia teve um impacto negativo sobre a história natural da LV. Assim, a infecção pelo HIV leva à redução da eficácia do tratamento e aumenta consideravelmente a probabilidade de recidivas. Ao mesmo tempo, a LV promove a progressão clínica da doença por HIV e o desenvolvimento da AIDS. Ambas as doenças são condições definidoras, pois exercem um efeito sinérgico negativo sobre a resposta imune celular. Pacientes que possuem a LV e são imunodeprimidos, seja pela infecção pelo HIV, desnutrição e uso de drogas injetáveis, por exemplo, possuem um aspecto clínico bastante variável da leishmaniose, apresentando manifestações clínicas atípicas e parasitológicas em razão do envolvimento de vários órgãos, frequentemente confundidas com outras infecções oportunistas (CARRANZA et al., 2009). As manifestações clínicas mais frequentes nos indivíduos coinfectados *Leishmania*-HIV são febre, esplenomegalia e hepatomegalia, semelhantes às dos casos de LV imunocompetentes (GOMES, et al., 2011).

3.4 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Devido à complexa interação parasito hospedeiro e a dificuldade de desenvolvimento de uma vacina eficaz, o controle da infecção em humanos ainda é feito por meio de intervenção quimioterápica. A maioria das drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses favorece o abandono por parte dos pacientes, pois são tóxicas, apresentam eficácia variada e,

em geral, tem sua administração intravenosa e por longos ciclos (ASSAN et al., 1995; ANTONIOU; GOUGH, 2005).

O antimoniato de N-metil glucamina-Glucantime® e estibogluconato de sódio são medicamentos de primeira escolha que têm sido recomendados e usados no tratamento da leishmaniose em humanos por mais de sessenta anos. Estas drogas são tóxicas, nem sempre efetivas, sendo usadas em esquemas prolongados no tratamento da LV. O principal efeito colateral do glucantime é sua ação sobre o aparelho cardiovascular, sendo desaconselhável sua utilização durante os dois primeiros trimestres de gravidez, além disso causam sintomas como pancreatite, arritmia cardíaca, falência renal, hepatotoxicidade e dor muscular, dados recentes indicam que a resistência aos antimoniais tem se tornado um problema na Índia e no Sudão (GONTIJO et al., 2004).

Como tratamentos alternativos no Brasil, são utilizadas a AmBisome e a Anf B - dispersão coloidal, que causam efeitos colaterais em altas doses, como cardiotoxicidade, falência renal e indução de diabetes, e as pentamidinas (sulfato e mesilato), que são aplicadas por via parenteral, e, por isso, podem provocar dor intensa, com formação de abscessos e até necrose muscular.

A miltefosine é a primeira droga anti-Leishmania, que é administrada por via oral. Foi, originalmente, desenvolvida como um agente antitumoral e, em geral, é bem tolerada, tendo mostrado uma taxa de 95% de cura efetiva em um estudo para tratamento do calazar indiano. Por ser potencialmente teratogênica, tem seu uso limitado em grávidas e nutrizes (GONTIJO et al., 2004).

Adicionalmente, um crescente número de estudos vem testando extratos naturais e imunomoduladores, como interferon gama e GM-CSF, para o tratamento alternativo da LV. No entanto, essas alternativas terapêuticas vêm mostrando ter eficácia variada (MORAES et al., 2018; GONTIJO et al 2004).

Estratégias baseadas na liberação controlada de fármacos, encapsuladas em nanopartículas ou lipossomas podem levar à redução dos efeitos colaterais, aumentar a biodisponibilidade, solubilidade e tempo de retenção de fármacos tóxicos, melhorando, assim, a eficácia do tratamento (KUMARI et al., 2010).

A Anf B foi desenvolvida em uma formulação encapsulada em lipossomas (AmBisome), que tem mostrado bons resultados, com taxa de cura de 90-95% na Índia (GONTIJO et al., 2004). Esta formulação também se mostrou mais eficaz que a fármaco não encapsulado, sendo a primeira escolha para o tratamento das leishmanioses na Europa e nos EUA. No entanto, seu alto custo limita o uso em países subdesenvolvidos e em

desenvolvimento (CHAPPUIS et al., 2007). Com base nesses resultados, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença.

3.5 PROTEÍNA DO CHOQUE TÉRMICO 90 (HSP90)

A Hsp90 é uma chaperona que atua no dobramento e estabilização de outras proteínas, chamadas de proteínas clientes (ISAACS et al., 2002). Essa proteína serve principalmente como uma chaperona molecular ajudando o dobramento correto de proteínas nascentes, evitando, desta forma, a formação de proteínas com estrutura terciária incorreta e formação de agregados proteicos. Alguns inibidores desta proteína agem ligando-se com grande afinidade ao domínio N – terminal, região onde ocorre a ligação do ATP, em condições normais.

Como alternativa ao tratamento das leishmanioses, nossa equipe vem estudando o papel de inibidores da proteína Hsp90, que mostraram efeito anti-parasitário. Em eucariotos, especialmente protozoários, várias proteínas regulatórias precisam interagir com a Hsp90 para completar o seu processo de dobramento. Entre estas proteínas estão tirosina-cinases, proteínas do citoesqueleto, histonas, fatores de transcrição, DNA polimerase que contam com um número enorme de funções celulares (PRATT; TOFT, 2003; ERLEJMAN et al., 2014). Além disso, Hsp90 também está envolvida no tráfego intracelular de proteínas, expressão de genes, controle do ciclo, diferenciação e desenvolvimento celulares (HARTL et al., 2011).

Existem inibidores da Hsp90, que impedem a capacidade dessas proteínas em hidrolisar ATP e, conseqüentemente, o dobramento correto das proteínas cliente (STEBBINS et al., 1997). Esses inibidores fazem parte da família de antibióticos das ansamicinas-benzoquinonas como a geldanamicina e o seu derivado o 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) (WHITESELL et al., 1994; PRODROMOU et al., 1997). Esses fármacos inibem a atividade da Hsp90 e proteínas cliente que passam a não ser dobradas ou serem dobradas erroneamente e são ubiquitiladas e degradadas pela via do proteassoma (ISAACS et al., 2003).

Em *Leishmania* spp., as proteínas cliente da Hsp90 tem um papel essencial no ciclo celular do parasito. A inibição de Hsp90 de promastigotas de *L. donovani* induz a mudança de forma para células arredondadas com redução do flagelo, além de induzir uma parada no ciclo celular na fase G2 e a expressão de proteínas A2, típicas da forma amastigota do parasito (WIESGIGL e CLOS, 2001). Inibidores da Hsp90 também foram utilizados contra doenças infecciosas causadas por *Plasmodium*, *Trypanossoma* e *Toxoplasma* com resultados promissores em todos os casos (AHN et al., 2003; BANUMATHY et al., 2003; KUMAR et

al., 2005; PALLAVI et al., 2010).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o 17-AAG, tem um alto efeito anti-*Leishmania in vitro* e *in vivo*. O tratamento com 17-AAG em concentrações que variaram de 25 a 500 nM, por 48 horas, foi capaz de reduzir em 90% os parasitas intracelulares, das espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* (PETERSEN et al. 2012; SANTOS et al. 2014), em doses que não foram tóxicas para o macrófago hospedeiro. O efeito leishmanicida de 17-AAG sobre as formas intracelulares do parasito se mostrou independente da produção de óxido nítrico (NO), de superóxido ($O_2^{\cdot -}$) bem como de moléculas pró-inflamatórias.

Em outro estudo conduzido pela nossa equipe, formulações lipossomais contendo o 17-AAG, foram capazes de reduzir a viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis*, em concentrações que não foram tóxicas para os macrófagos murinos. De forma similar, essas formulações, também reduziram significativamente a viabilidade intracelular desses parasitos, após 6 e 72 horas de tratamento, em concentrações tão baixas quanto 0,006 nM quando comparadas a mesma concentração do 17-AAG solúvel e a Anf B na concentração de 2 μ M. O tratamento com as formulações não causou alteração na produção de óxido nítrico (NO) em relação ao macrófago controle infectado e não tratado. Adicionalmente, foi observado que o tratamento com as formulações lipossomais provocou alterações morfológicas no parasito como perda da eletrodensidade citoplasmática, mitocrôndrias dilatadas, alterações morfológicas no núcleo, presença de vacúolos no interior do citoplasma com subsequente aparecimento de parasito com aspecto degradado (PETERSEN et al., 2018).

Em um estudo *in vivo*, utilizando o modelo murino de leishmaniose tegumentar causado por *L. braziliensis*, foi avaliada a capacidade terapêutica do INH-2, análogo do 17-AAG, porém hidrossolúvel e com melhores propriedades farmacocinéticas (EGORIN et al. 2002). Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com promastigotas de *L. braziliensis* e divididos em grupos que foram tratados com 20 mg/kg de INH-2 por via intraperitoneal diariamente ou tratados com veículo diluente controle. Animais tratados com INH-2 tiveram o tamanho máximo da lesão de 0,3 mm enquanto animais não tratados que receberam apenas a injeção do veículo apresentaram uma lesão mais que duas vezes maior que 0,8 mm. Também foi determinada a carga parasitária da orelha e do linfonodo drenante após duas e quatro semanas de tratamento. Foi observada uma redução drástica da carga parasitária nos animais tratados com INH-2. Após quatro semanas de tratamento, apenas um animal apresentou parasitos na lesão dentre os animais tratados, enquanto os animais do grupo controle apresentaram uma média de 5×10^7 parasitos por lesão.

Adicionalmente, detectamos no sobrenadante de células do linfonodo de animais infectados e tratados redução importante na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-gama, TNF-alfa e IL-6 nos animais tratados com INH-2 em relação aos animais controle. Em conjunto, esses dados reforçam o potencial leishmanicida de inibidores da Hsp90, em especial o INH-2 pelos excelentes resultados obtidos *in vivo* em modelo murino, como potencial composto quimioterápico. Esses compostos além de diminuírem a carga parasitária, podem, adicionalmente, ter efeito benéficos anti-inflamatórios no tratamento. intenso (BARRAL-NETTO et al., 1987), porém, pouco se sabe da atividade leishmanicida do INH-2 em modelos de LV causado pela *L. infantum*.

3.6 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

É conhecido que sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos podem melhorar a eficácia do tratamento, pois possuem diversas vantagens em relação aos fármacos na sua forma livre, apresentando como principal vantagem a redução dos efeitos colaterais, pois possibilita a utilização de uma menor dose do fármaco para garantir a eficácia do tratamento (FORMIGA; ANSORENA, 2009; LI et al., 2017).

Nanopartículas e lipossomas têm sido investigados como novas formas de dosificação com vantagens em relação às formulações tradicionais: liberação controlada de ativos, solubilização de ativos lipofílicos, aumento na estabilidade de moléculas lábeis e menor possibilidade de causar efeitos colaterais. Estes sistemas também apresentam a capacidade de carrear fármacos para sítios específicos no organismo, otimizando, assim, sua eficácia e reduzindo sua toxicidade (FORMIGA; ANSORENA, 2009; LI et al., 2017).

Há relatos na literatura da utilização de diferentes nanoformulações para o tratamento das leishmanioses *in vitro*, dentre essas se destacam os: nanotubos de carbono, lipossomas e nanopartículas. Saudagar e Dubey em 2012, utilizaram nanotubos de carbono (Be-NTCf) conjugado ao Betulin, uma substância leishmanicida presente na casca das árvores de vidoeiro branco. Esse nanossistema, Be-NTCf, foi mais eficaz contra formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* e mais tóxico para as células não infectadas do que o Betulin livre.

Em 2012, Prajapati e colaboradores relataram o efeito, *in vitro* e *in vivo*, de nanotubos de carbono incorporados com uma droga leishmanicida, a Anf B (AnfB-NTCf) sobre *L. donovani*. Segundo esses autores a concentração de AnfB-NTCf necessária para provocar a morte de 50% dos macrófagos (CC₅₀) é quase quatorze vezes maior do que a concentração da Anf B livre, embora ambas formulações induzissem nível de toxicidade semelhante *in vitro*.

Em modelo experimental de LV em hamsters, os autores demonstraram que quando administrada oralmente a AnfB-NTCf inibiu em 99% a taxa de crescimento do parasito no baço de animais infectados.

Lipossomas encapsulados com drogas anti-Leishmania passaram a ser utilizados no tratamento da leishmaniose a partir da década de 70 (ALVING et al., 1978). Foi demonstrado que antimoniais encapsulados em lipossomas foram mais eficazes que a droga livre. Posteriormente, Chapman e colaboradores (1984) observaram que a formulação de N-metil-glucamina lipossomal (1.94 mg Sb/kg/dia) administrada em quatro injeções diárias por via intravenosa levaram a eliminação dos parasitos presentes no baço de cachorros com LV. Mais recentemente, foi demonstrado que essa formulação de N-metil-glucamina encapsulada em lipossomas mostrou eficácia 10 - 63 vezes superior ao fármaco livre contra amastigotas intracelulares de *L. major* (BORBOREMA et al., 2011).

A Anf B encapsulada em lipossomas (AmBisome) foi capaz de eliminar parasitas de *L. donovani* no fígado e baço de hamsters e macacos (*Saimiri sciureus*) infectados (Berman et al, 1986). De forma similar (GRADONI et al., 1993) demonstraram que três doses consecutivas de Ambisome durante três dias eliminaram completamente o parasita presente no baço sem causar toxicidade. O Ambisome também se mostrou mais eficaz do que outras formulações lipídicas de Anf B, Amphocil e Abelcet, (YARDLEY; CROFT, 2000). Na Europa, na África e na Ásia, a AmBisome lipossomal é indicada como droga de primeira escolha para o tratamento de LV com doses de 20 mg/kg em pacientes imunocompetentes (BERN et al., 2006). Na Índia, há relatos de taxa de cura de 97% dos pacientes com LV tratados com AmBisome cujas doses eram de 5 mg/kg (SUNDAR et al., 2011). Nas Américas, pacientes com LC causada por *L. braziliensis* apresentaram cura completa das lesões com o tratamento com Ambisome por um período inferior a um mês após (SOLOMON et al., 2007).

Atualmente, o uso de sistemas de liberação controlada vem crescendo e a busca por polímeros para aplicações biomédicas experimentou um importante avanço nas últimas três décadas, sobretudo, o estudo e desenvolvimento de polímeros sintéticos como componentes importantes de matrizes utilizadas como vetores de moléculas terapêuticas (FORMIGA et al., 2009).

A utilização de polímeros para o desenvolvimento de nanopartículas apresentam muitas vantagens, dentre elas: ser completamente degradados e eliminados do organismo, ser utilizados para encapsular tanto substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas, oferecem proteção ao principio ativo nas condições biológicas e apresentam baixa imunogenicidade (FORMIGA et al., 2009; LI et al., 2017).

Dentro de polímeros sintéticos, os poliésteres destacam-se pela sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Os mais utilizados são ácido láctico (PLA) e copolímeros formado por unidades monoméricas de ácido láctico e glicólico (PLGA), uma vez que foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para desenvolver sistemas para a administração de fármacos. Adicionalmente, a policaprolactona (PCL) também tem sido muito utilizada na última década para encapsulamento de princípios ativos de diferentes grupos farmacológicos, além de possuir boa biocompatibilidade e baixa imunogenicidade (FORMIGA, 2009; LI et al., 2017).

Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos consistirá em uma inovação útil no incremento de alternativas para o tratamento das leishmanioses, pois viabilizará a administração do INH-2 em uma formulação que aperfeiçoe a dose terapêutica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos BALB/c foram fornecidos e mantidos no biotério do IGM-FIOCRUZ e foram manipulados de acordo com as normas descritas no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA número 003/2018).

4.2 PARASITOS

Os parasitos da espécie *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262) foram isolados do baço de hamsters da linhagem *Golden Syrian* e, posteriormente, cultivados em meio mínimo essencial modificado hemoflagelado médio (meio HOMEM) completo, suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado (SBF) (Gibco®) e 24.5 mM hemina bovina (Sigma, Steinheim, Germany). As formas promastigota transformadas a partir de amastigotas presentes no baço foram mantidas em meio HOMEM completo por 7 passagens sucessivas e foram utilizadas ao alcançarem a fase estacionária de crescimento (aproximadamente 3×10^7).

4.3 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS

Células precursoras, presentes na medula óssea, foram obtidas a partir da lavagem da cavidade óssea do fêmur e da tíbia de camundongos da linhagem BALB/c cultivadas em meio RPMI completo [meio Roswell Park Memorial Institute 1640 suplementado com 25 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina N'-2-etanosulfônico) (Sigma) pH 7,4, 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 10% de SBF inativado (Gibco), 10 µg/mL de ciprofloxacina (Isofarma, Precabura, CE, BR), 200 mM glutamina (Sigma)] e 30% de sobrenadante de células L929 (SBN L929). Após 3 ou 4 dias de cultivo, a cultura celular foi suplementada com meio RPMI/SBN L929 e, após três dias, os BMMΦ aderidos foram recuperados por lavagem da placa de cultura com solução de PBS contendo 1 mM de EDTA, centrifugados a 300 G por 10 min a 4 °C e ressuspensos em 1 mL de meio RPMI completo para realização dos experimentos.

4.4 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ENCAPSULAMENTO DO INH-2 EM NANOPARTÍCULAS

INH-2 foi incorporado em nanopartículas poliméricas utilizando os polímeros PLGA (poli (ácido lático-co-ácido glicólico)) (Sigma, Brasil) ou PCL (policaprolactona) (Sigma, SP, Brasil), além de diferentes metodologias, a fim de verificar o método que gerasse nanopartículas apresentando encapsulamento mais eficaz de INH-2 e características ideais quanto ao tamanho, potencial zeta e polidispersão. Todas as metodologias testadas estão descritas a seguir, para a primeira metodologia descrita, foi utilizado apenas o polímero PCL e para as duas últimas utilizamos adicionalmente o PLGA.

Tabela 1 - Formulação das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação a partir de polímeros pré-formado

	Fase Orgânica	Fase Aquosa
Polímero	250 mg	
Span 60	165 mg	
Acetona	67 mg	
INH-2	25 mg	
Tween 80		190 mg
Água destilada		133 mg

Fonte: Elaboração da autora

4.4.1 Método nanoprecipitação a partir de polímeros pré-formados

Inicialmente, foram produzidos três protocolos da nanoformulação branca (sem o composto), e um com o composto, utilizando o método de nanoprecipitação, também conhecido como Método de Deslocamento do Solvente (FESSI et al., 1989), os passos serão descritos à seguir:

O método de nanoprecipitação é composto por duas fases, sendo elas: fase orgânica e fase aquosa. Para a preparação da nanoformulação, inicialmente realizou-se a preparação da fase orgânica, por meio da solubilização do Span 60, em acetona sob agitação magnética (300 RPM) até total solubilização do composto. Em seguida, esta solução foi então filtrada através do filtro de seringa (porosidade, 0,22 μm). Na próxima etapa, foi adicionado o polímero PCL à solução filtrada que foi mantida sob agitação magnética (300 RPM) até completa solubilização a 40 °C. Ao final da formação da fase orgânica, foi medido o volume final com auxílio de uma proveta, e adicionado o volume de solvente perdido na evaporação.

Posteriormente, ocorreu a formação da fase aquosa, com a solubilização de Tween 80 em água destilada sob agitação magnética a 300 RPM. Em seguida, a fase orgânica foi vertida lentamente à fase aquosa sob agitação de 230 RPM, por último, a solução final permaneceu sob agitação magnética por 20min em temperatura ambiente e então a amostra foi levada ao rotaevaporador (Buchi® R-100, Suíça) para eliminação do solvente orgânico nas condições de pressão 300 ± 10 mbar, 65°C .

Após a produção, as nanopartículas foram recuperadas e purificadas por ultracentrifugação (BeckmanCoulter®, Avanti® J-26 XPI, EUA) a 17.000 G (rotor JA-12) em dois ciclos de 30 min, 4°C . O precipitado formado foi ressuspensionado em 5 mL de água destilada e foi retirada da solução final alíquotas para determinação da eficiência de encapsulamento e caracterização físico-química da nanoformulação.

4.4.2 Método de emulsão dupla por extração de solvente (Salvador et al. 2015, com modificações)

Para melhorar a eficiência de encapsulamento, novos protocolos de nanoformulações foram produzidos com os reagentes e suas concentrações listados na tabela 2.

Tabela 2 - Formulação das nanopartículas pelo método de emulsão dupla por extração do solvente.

	Fase Aquosa Interna (W1)	Fase Orgânica (FO)	Fase Aquosa Externa (W2)
PLGA 50:50		50 mg	
PEG 8000 ou Pluronic F-127	125 mg/250 mg		
Acetona		5 ml	
INH-2		10 mg	
PVA 1%			10 ml
Água dest.	5 ml		

Fonte: Elaboração da autora

O método de emulsão dupla consiste em três etapas, sendo elas: fase aquosa interna (W1), composta pelos seguintes componentes: PEG (Polietilenoglicol) (Sigma) ou Pluronic F-127 (Sigma), nas concentrações de 2,5 e 5% em água destilada. Ambos funcionam como estabilizantes para a nanoformulação, além de melhorar a solubilidade do composto, facilitando assim sua incorporação na nanopartícula; fase orgânica (FO), composta por PLGA,

acetona, e o INH-2 e a fase aquosa externa (W2), composta por álcool polivinílico a 1% (PVA 1%). Para a produção da nanoformulação utilizando esta metodologia, foram realizados os seguintes passos: PLGA (50 mg) foi dissolvido em acetona (5 mL) sob agitação magnética a 350 RPM em temperatura ambiente até total solubilização. Posteriormente, vertemos a W1 na FO utilizando o sonicador (potência de 6 W e ciclo de trabalho constante por 2 min, sob gelo), produzindo assim a emulsão primária W1/O. Em seguida, incorporamos a W2 na W1/O protegidas da luz sob homogeneização turbulenta (Ultra Turrax T25) 10.000 rpm por 5 min, mantidas em banho de gelo. Após a formação da emulsão dupla, adicionamos 10 mL de isopropanol a 2% (v/v) sob agitação magnética e deixamos sob agitação overnight para permitir a total evaporação do solvente.

4.4.3 Método de precipitação/evaporação da solvente emulsão simples (Barrichello et al, 1999 com adaptações)

A emulsão simples é composta apenas por duas fases, sendo elas: a fase orgânica (FO) e uma fase aquosa interna (W1). Para a produção das nanoformulações, foram utilizadas as mesmas concentrações descritas no item 4.9.2, Método de emulsão dupla por extração de solvente (Salvador et al. 2015, com modificações), variando apenas a composição, tendo PEG ou Pluronic-F127 (375 mg) em 15 ml de água destilada. Posteriormente, o PLGA (50 mg) foi dissolvido em 5 mL de acetona sob agitação magnética até total solubilização. Em seguida, a FO foi adicionada em 15 mL de uma solução aquosa de PEG 8000 ou Pluronic-F127 sob agitação magnética à temperatura ambiente e, em seguida, a acetona foi removida da suspensão no rotaevaporador (BUTCHI® R-100), à temperatura de 56 °C (temperatura de ebulição da acetona), 3 RPM, 350 mBar, até que a solução se torne concentrada a um volume final de 10 mL.

Ao final das metodologias descritas nos itens 4.4.2. e 4.4.3., a eficiência de encapsulamento por HPLC foi determinada utilizando UV visível e espectrofotômetro.

4.4.4 Quantificação da eficiência de encapsulamento das nanoformulações (EE%)

Para quantificação da eficiência de encapsulamento, foram utilizadas duas técnicas, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – SENAI CIMATEC) e UV visível por meio de espectrofotômetro (SPECTRA Max 340 PC). Para técnica de HPLC, estabelecemos uma curva padrão do INH-2 livre a partir de 10 µM, com limite de detecção de 334 nm. Para

quantificação utilizando UV visível, determinamos o λ max que foi de 340nm e igualmente construímos uma curva padrão de INH-2 (mesma faixa de concentração). Para a realização de ambas as técnicas, realizamos a separação das frações livre por ultrafiltração – centrifugação usando filtro Amicon (14.000g, 1 h, 4 °C), e total, após o rompimento das nanopartículas com etanol na proporção 1:1, seguida de centrifugação (8.000 RPM, 5 min, 4 °C). O percentual de encapsulamento e concentração teórica, que corresponde a quantidade de composto em gramas, após a total evaporação do solvente (acetona) foram calculados da seguinte maneira, respectivamente:

$$\%EE_{INH-2} = ([TOTAL_{INH-2}] - [LIVRE_{INH-2}]) \div [TOTAL_{INH-2}] \times 100$$

$\%EE_{INH-2}$ – Eficiência de encapsulamento do INH-2;

$TOTAL_{INH-2}$ - Concentração total do INH-2 colocada no preparo da nanoformulação;

$LIVRE_{INH-2}$ – Concentração de INH-2 não encapsulada nas nanoformulações.

$$CCte = \left(\frac{MASSA_{total}}{VOLUME_{final}} \right)$$

CCte –Concentração teórica de INH-2;

$MASSA_{total}$ – Massa total de INH-2 usada para preparação da nanoformulação;

$VOLUME_{final}$ – Volume final da solução após total de evaporação da acetona.

4.4.5 Caracterização físico-química das nanopartículas

As formulações de nanopartículas poliméricas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, polidispersão (PDI), aspecto visual e pH. Potencial zeta, tamanho das partículas e polidispersão foram determinados utilizando Zetasizer Nano Series Nano-ZS, pelo método de espalhamento de luz dinâmico (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Para a medida de tamanho da partícula, as análises foram realizadas a 25 °C sob ângulo de espalhamento de luz. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. As características morfológicas e de superfície foram avaliadas em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV).

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS MURINOS APÓS O TRATAMENTO COM INH-2

Macrófagos derivados de precursores de medula óssea (BMMØ) foram distribuídos em placas de 96 poços na concentração de 5×10^4 células por poço (200 μ L) e tratadas com

concentrações decrescentes diluídas de forma seriada a partir da concentração inicial de 50 μM de INH-2 ou 49,36 μM de nanopartícula PLGA-PEG 5% por 48 h. Após esse período, foram acrescentados 10% do corante AlamarBlue (Invitrogen, EUA) e incubados a 37 °C, por mais 24 h. A absorbância foi determinada nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

4.6 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM* COM INH-2

BMMØ foram obtidos conforme descrito no ítem 4.3 Obtenção e cultura de macrófagos e cultivados em RPMI completo em estufa a 37°C suplementada com 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período, os BMMØ foram infectados com promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária na proporção de 20:1 e mantidos a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂. Após 24 h de infecção, os macrófagos foram lavados 2 vezes com solução salina para remoção dos parasitas não internalizados e, em seguida, foram tratados com concentrações diluídas de forma seriada a partir da concentração de 500 nM de INH-2. Após 48 e 72 horas, os macrófagos foram lavados 2 vezes com solução salina e incubados em meio de cultura HOMEM por 12 dias a 24 °C na estufa B.O.D, as promastigotas viáveis foram então quantificadas por contagem em câmara de Neubauer.

4.7 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE *LEISHMANIA* APÓS TRATAMENTO COM INH-2

BMMØ foram distribuídos em placas de 6 poços na concentração de 2×10^6 células por poço (2 mL), e cultivadas em RPMI completo a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂. Após 24 h de incubação, os BMMØ foram infectados com promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária na proporção de 20:1 e mantidos a 35°C em estufa suplementada com 5% de CO₂. Após 24 h, as células foram lavadas para remoção dos parasitas não internalizados e tratadas com INH-2 na concentração referente ao valor do IC₅₀. Após 24 h de tratamento, as amostras foram processadas para análise em microscopia eletrônica de transmissão, como a seguir: as células foram fixadas em uma solução contendo glutaraldeído grau II a 2,5%, formaldeído a 2% e CaCl₂ 2,5 mM e tampão de cacodilato de sódio 0,1 M ajustado para pH 7,2. Em seguida, as células foram pós-fixadas em um tampão similar contendo 1% de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio a 0,8%, depois foram desidratadas em sucessivas lavagens de acetona e incorporadas em resina Polybed. Cortes

finos foram feitos e as amostras foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Observações foram realizadas usando o microscópio de transmissão Zeiss 109 ou Jeol 1230.

5.8 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO), CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E QUIMIOCINAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. INFANTUM*

BMMØ foram distribuídos na concentração de 10^6 células/poço (500 µL) e estimulados com IFN- γ (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e/ou LPS overnight nas concentrações de 100 ng/mL e 1 ng/mL. Como controle negativo, as células infectadas foram incubadas em meio sem estímulo com IFN- γ e LPS. Após esse período, as células foram lavadas e reestimuladas com IFN- γ e/ou LPS e tratadas com concentração referente ao valor do IC₅₀. Após 48 h de tratamento, o sobrenadante foi coletado e a produção de NO foi quantificada nos sobrenadantes de células por determinação de acumulação de nitrito, utilizando o método de Griess (DING et al., 1988). Os sobrenadantes das culturas de BMMØ também serão utilizados para determinação da produção de citocinas inflamatórias utilizando o CBAkit (BD Biosciences, USA), seguindo instruções do fabricante.

Os experimentos descritos nos itens 4.8 e 4.9, não foram realizados devido a suspensão das atividades no Instituto, causado pela pandemia do novo Coronavírus (SARS-CoV-2). Os mesmos serão realizados no doutorado.

5 PROPOSTA DE ANÁLISE

Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes em quintuplicata e os dados numéricos foram apresentados em gráficos, como valores absolutos, médias, medianas ou proporções, utilizando o GraphPad 5.0. O IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados com base numa análise de regressão não-linear onde CC₅₀ corresponde à concentração letal capaz de reduzir em 50% a viabilidade dos macrófagos e o valor de IC₅₀ representam a concentração de inibidor necessária para matar 50% dos parasitas. A diferença entre os grupos foi calculada utilizando o teste ANOVA para dados com distribuição normal ou Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFORMULAÇÕES PRODUZIDAS UTILIZANDO PROTOCOLO DE NANOPRECIPITAÇÃO

Inicialmente, três protocolos de nanoformulações utilizando nanoprecipitação foram produzidos sem o INH-2, isto é, nanopartículas vazias, contendo, na sua composição: polímero (PCL), Span 60, acetona, Tween 80 e água destilada. Na Tabela 1, são mostrados os resultados das caracterizações dessas nanopartículas, onde os números 1 a 3 representam réplicas da nanopartícula vazia (sem o composto), que foram feitas com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do método.

Tabela 3 - Caracterização por DLS de nanopartículas preparadas por nanoprecipitação

Nanopartícula	Tamanho (nm)	PDI	ZETA (mV)
1 (vazia*)	165,6	0,084	-22,3
2 (vazia*)	208	0,132	-25,9
3 (vazia*)	161,6	0,059	-25,5
4 (INH-2)**	183,1	0,089	-28,8

*Partículas vazias (1,2 e 3) e **partículas com composto encapsulado (4)

Fonte: Elaboração da autora

Como observado na Tabela 1, as nanopartículas apresentaram tamanhos com variação de 161 a 208 nm. O índice de polidispersão (PDI) variou de 0,059 a 0,132. Com relação ao potencial zeta, as nanopartículas vazias apresentaram cargas que variaram de -22,3 a -25,9. A nanopartícula contendo o composto (número 4), apresentou características similares às nanopartículas vazias, com tamanho de 183,1 nm, PDI de 0,089 e potencial zeta de -28,8 mV (tabela 1). Adicionalmente, o aspecto morfológico das nanopartículas produzidas por nanoprecipitação foi avaliado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e as imagens são mostradas na figura 2.

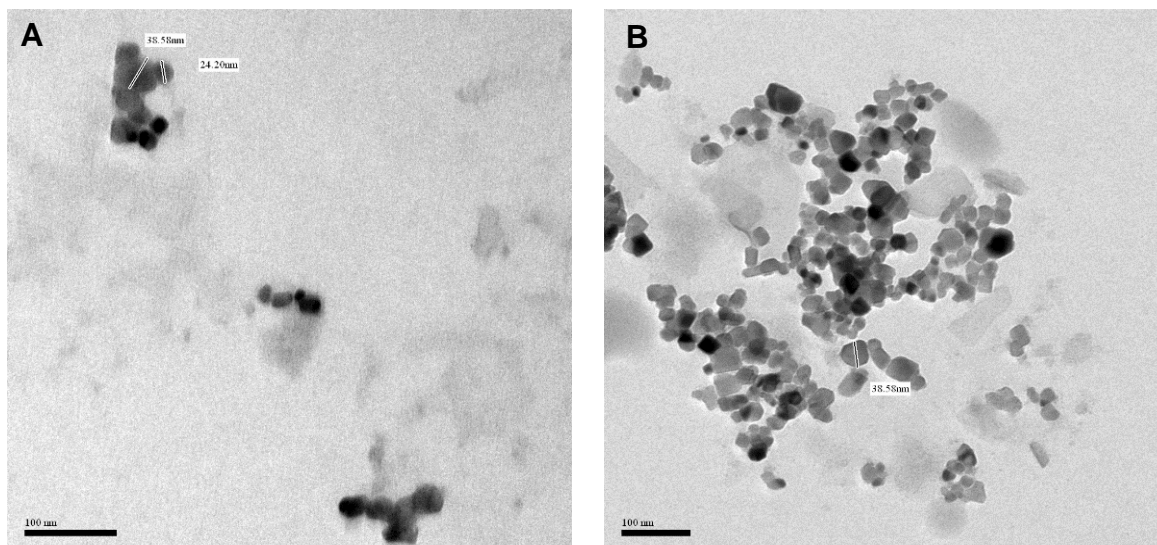


Figura 2 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nanopartículas vazias (A) ou contendo o INH-2 (B) foram preparadas, inicialmente, com a solubilização do Span 60 em acetona, sob agitação magnética. Em seguida, foi adicionado o polímero à solução filtrada que foi mantida sob agitação magnética, até completa solubilização. Posteriormente, o Tween 80 foi solubilizado em água destilada sob agitação magnética. Por último, a solução final permaneceu sob agitação magnética em temperatura ambiente e, então, a amostra foi levada ao rotaevaporador para eliminação do solvente. Após o preparo das nanopartículas por nanoprecipitação, as amostras foram lavadas e então diluídas na proporção de 1:10 em água destilada. Posteriormente, 10 μ L de cada amostra foram gotejados em *parafilm* e foi posicionada sobre elas uma grade de *formvar*, previamente preparadas pela plataforma de microscopia eletrônica do IGM, durante 1 min. Depois, cada amostra foi incubada com acetato de uranila 2% por 2 min para contrastação das nanopartículas. Por fim, o excesso de uranila foi removido da grade com auxílio de papel filtro e as amostras foram deixadas à temperatura ambiente até as análises pelo microscópio eletrônico de transmissão JEM-1230 (JEOL LTD, Japan).

Fonte: Elaboração da autora

A análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou que as nanopartículas vazias (Figura 2A) e aquelas contendo o composto encapsulado (Figura 2B) apresentaram formato e tamanho homogêneos entre si, corroborando o resultado de distribuição de tamanho avaliado por DLS.

6.2 QUANTIFICAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES PRODUZIDAS UTILIZANDO PROTOCOLO DE NANOPRECIPITAÇÃO

Após a caracterização das nanoformulações, a eficiência de encapsulamento foi quantificada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A Figura 3 mostra o cromatograma obtido das soluções em diferentes concentrações preparadas para construção da curva de calibração, que é mostrada na Figura 4. A quantificação da %EE da nanoformulação produzida é mostrada na tabela 2.

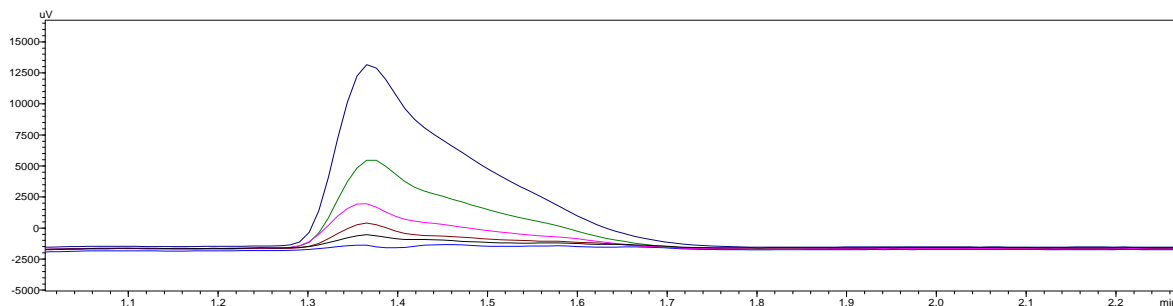


Figura 3 – Cromatograma das soluções de INH-2, obtido por HPLC. Foram preparadas soluções de INH-2 com concentrações diluídas, de forma seriada, de 10 µg/mL a 0,62 µg/mL. Em seguida, cada concentração foi analisada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e as áreas sob a curva de cada concentração foi utilizada para construção da curva de calibração.

Fonte: Elaboração da autora

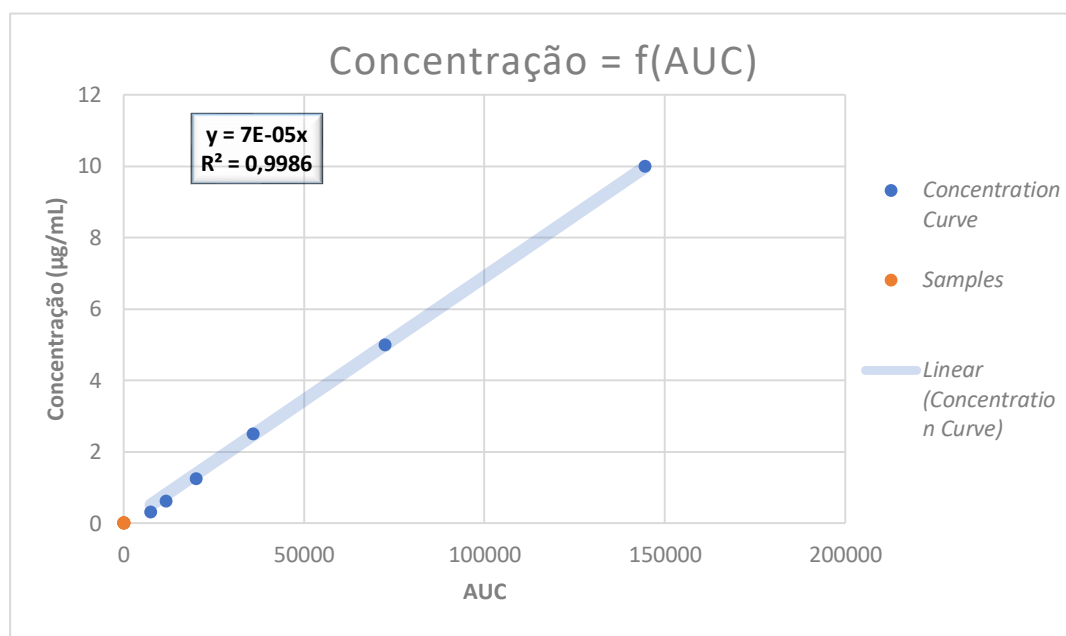


Figura 4 - Curva de concentração do INH-2 por HPLC. Foram preparadas soluções de INH-2 com concentrações diluídas, de forma seriada, de 10 µg/mL a 0,62 µg/mL, e essas soluções foram analisadas por HPLC. A área sob a curva do cromatograma de cada concentração foi utilizada para montagem da curva padrão, utilizando o Excel.

Fonte: Elaboração da autora

No cromatograma observado na Figura 3, cada pico representa uma concentração previamente conhecida, que variaram de 10µg/mL a 0,62µg/mL. No eixo X, é possível observar o tempo de retenção de cada concentração e, no eixo Y, a sua respectiva absorbância.

Na Figura 4 é mostrada a curva de calibração das mesmas concentrações mostradas no cromatograma (figura 3). No eixo X, estão representadas as concentrações do INH-2 e, no eixo Y, a área sobre a curva de cada concentração. O valor do coeficiente angular (r^2) obtido foi maior que 0,99 e próximo a 1, o que indica que a nossa reta de regressão linear alcançou o

resultado esperado e que esta curva pode ser utilizada para quantificação do composto.

Após a construção da curva de calibração, a %EE do INH-2 nas nanopartículas foi avaliada e é mostrada na tabela 2. Após três lavagens sucessivas das nanopartículas preparadas, as concentrações do composto encapsulado nas nanopartículas (%EE) foi reduzido de 194,5 µg/mL, para 186 µg/mL, 129,6 µg/mL e 2,6 µg/mL, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 4 - Quantificação da %EE em diferentes estágios do protocolo para preparo de nanoformulação pelo método de nano precipitação

Etapas da Centrifugação	Concentração (µg/mL)
Não centrifugado	194,5
Sobrenadante 1	186,0
Sobrenadante 2	129,6
Sobrenadante 3	2,6

Fonte: Elaboração da autora

Com base nos resultados, observamos que o método utilizado para quantificação, chamado de purificação, não foi adequado, visto que a cada lavagem e centrifugação perdíamos quantidades significativas do composto.

6.3 PRODUÇÃO DE NANOFORMULAÇÕES UTILIZANDO PROTOCOLOS DE EMULSÃO SIMPLES E EMULSÃO DUPLA

Com o objetivo de melhorar a %EE das nanoformulações, dois novos protocolos foram testados com quatro variações na concentração de insumos utilizados cada, como mostrado na figura 5. Os oito protocolos utilizaram o PLGA como polímero, a acetona como solvente, o PVA na concentração de 1% e o composto a ser encapsulado, INH-2, além de água destilada, cujo método de preparo encontra-se descrito no item 4.9.3 dos Material e Métodos. Além do método de produção, as outras variações testadas foram equivalentes ao tipo de estabilizante onde, nos protocolos de 1 a 4, utilizamos PEG e, nos protocolos 5 a 8, empregamos Pluronic-F127. Nos protocolos 1 e 2 foi avaliado o efeito das concentrações de 2,5% de PEG e nos protocolos 3 e 4 foi avaliada a concentração de 5%. Nos protocolos 5 e 6

foi avaliado o efeito das concentrações de 2,5% de Pluronic-F127 e nos protocolos 7 e 8 foi avaliada a concentração de 5%. Os protocolos 1, 3, 5 e 7 foram realizados por emulsão dupla e os protocolos 2, 4, 6 e 8 foram realizados por emulsão simples. Em termos de composição, as formulações preparadas pelo método de emulsão simples apresentam duas fases, enquanto que aquelas preparadas por emulsão dupla possuem três fases. Os resultados desses testes são mostrados na Tabela 3.

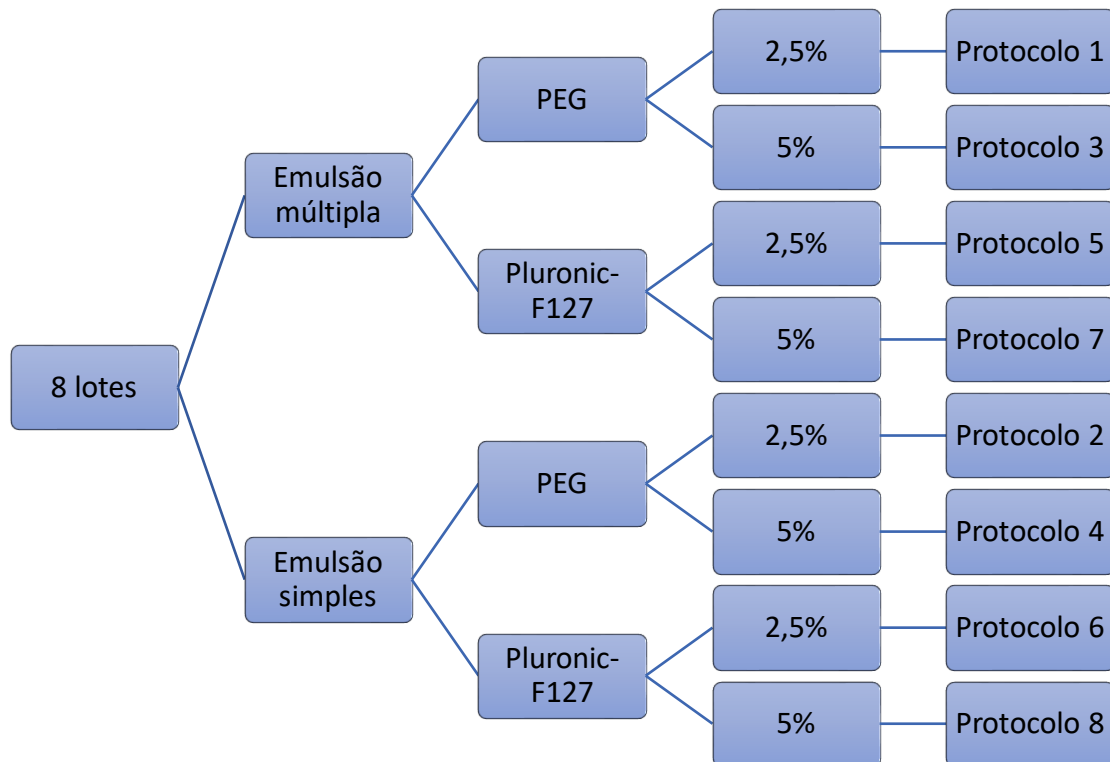


Figura 5 – Diagrama descritivo dos novos protocolos testados.

Fonte: Elaboração da autora

Tabela 5 - Determinação da %EE em nanoformulações produzidas utilizando variações nos insumos dos protocolos de emulsão dupla e emulsão simples.

Protocolo	Co-polímero	Concentração	Método de emulsão	%EE	Concentração (µg/mL)
1	PEG	2,5%	Múltipla	-1,708	0,229
2	PEG	2,5%	Simples	14,136	0,036
3	PEG	5,0%	Múltipla	-16,108	0,140
4	PEG	5,0%	Simples	47,338	0,280
5	Pluronic	2,5%	Múltipla	21,981	0,149
6	Pluronic	2,5%	Simples	32,679	0,231
7	Pluronic	5,0%	Múltipla	28,009	0,061
8	Pluronic	5,0%	Simples	37,952	0,0399

Fonte: Elaboração da autora

Como podemos observar na Tabela 3, apenas o protocolo 4 apresentou %EE com valor elevado, de 47,33%. Assim, decidimos repetir este protocolo para avaliar a reprodutibilidade do ensaio. Os resultados das repetições são mostrados na tabela 4.

Tabela 6 - Avaliação da reprodutibilidade da %EE do INH-2 em nanoformulação preparada por emulsão simples

Réplicas do protocolo 4	%EE
1	- 55,949
2	- 63,178
3	- 31,523
4	- 74,862
5	65,5

Fonte: Elaboração da autora

Como observado na Tabela 4, em 5 repetições do protocolo 4, apenas em uma delas obtivemos uma %EE com valor de 65,5%, nível superior ao ensaio anterior descrito acima. As outras quatro repetições do protocolo 4 apresentaram resultados negativos, que atribuímos a uma eficiência de encapsulamento de 0, indicando que não houve incorporação do composto ao polímero.

6.4 ESTABELECIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO INH-2 EM NANOFORMULAÇÕES

Como a baixa reprodutibilidade entre as amostras poderia estar relacionada à baixa sensibilidade do método empregado, estabelecemos um novo método analítico por espectrofotometria utilizando UV visível (UVvis) para quantificação do INH-2 em nanoformulações.

O primeiro passo foi a montagem de uma nova curva padrão para escolha do melhor método analítico para quantificação do INH-2, como mostrado na Figura 6. Para avaliar a influência dos insumos empregados na quantificação do INH-2, a curva padrão foi realizada utilizando as soluções contendo: 1 - 50 mg de PLGA / 5 ml de acetona; 2 - 3,33 mg de INH-2 / 5 ml de água; 3 - 250 mg de PEG / 5 ml de água.

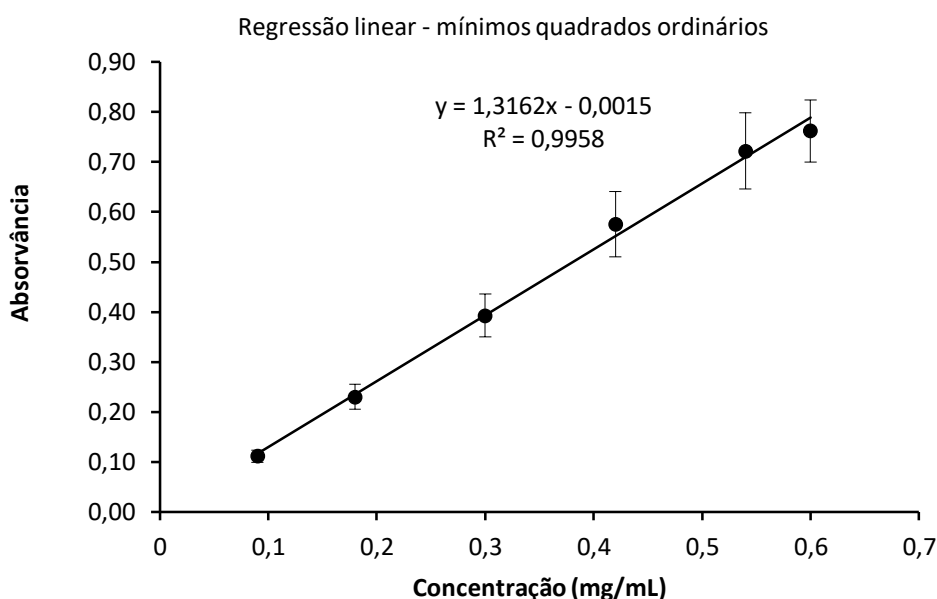


Figura 6 - Curva padrão para quantificação das nanoformulações contendo INH-2. Foram preparadas soluções conhecidas do INH-2, diluídas de forma seriada, de 0,1 mg/mL a 0,7 mg/mL. Essas soluções foram analisadas em UV visível para leitura das respectivas absorvâncias e montagem da curva padrão.

Fonte: Elaboração da autora

A regressão linear observada na nova curva representada na Figura 6, assim como a anterior, alcançou o resultado esperado para uma curva padrão, com o valor do R^2 maior que 0,99 e próximo a 1.

6.5 PREPARO DE NANOFORMULAÇÃO UTILIZANDO O MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES

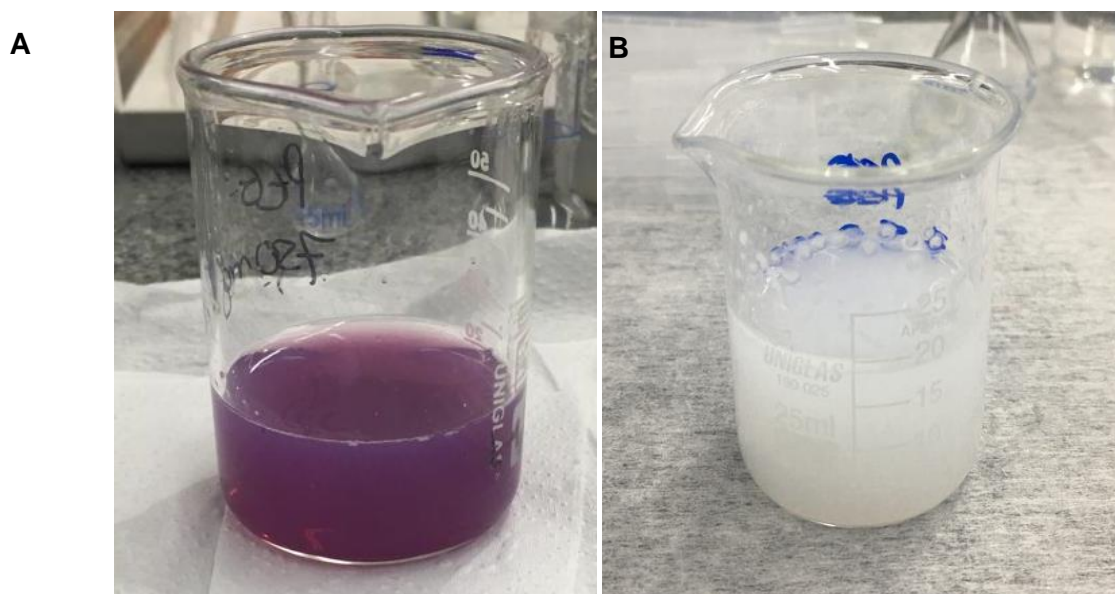
Em seguida, utilizando o método analítico descrito no item anterior, avaliamos a %EE, das nanoformulações produzidas pelo método de emulsão simples. Os resultados são mostrados na tabela 5.

Tabela 7 - Caracterização das nanoformulações utilizando o método de emulsão simples, quanto ao tamanho, PDI e %EE

Nanoformulação	PDI	%EE	Tamanho (nm)
VAZIA	0,110	-	178,7
INH-2	0,066	10,3	207,8

Fonte: Elaboração da autora

A primeira nanoformulação produzida, utilizando os mesmos insumos descritos anteriormente, mostrou o valor de %EE igual a 10,3%. As caracterizações da nanoformulação vazia utilizando o protocolo de emulsão simples, em comparação com aquela em que INH-2 foi encapsulado, mostrou que a incorporação do composto causou um aumento no tamanho (178,7 nm para 207,8 nm) e diminuição no PDI (0,110 para 0,066). Adicionalmente, o aspecto visual das nanoformulações pode ser observado na Figura 7.



Figuras 7 - Aspecto visual das soluções contendo nanofomulações produzidas pelo método de emulsão simples. Para a produção das nanopartículas vazias (A) ou com o INH-2 (B), 50 mg de PLGA foi dissolvido em 5 mL de acetona sob agitação magnética até total solubilização. Em seguida, a FO foi adicionada em 15 mL de uma solução aquosa de PEG 8000, sob agitação magnética, à temperatura ambiente e, em seguida, a acetona foi removida da suspensão no rotaevaporador (BUTCHI® R-100), à 56 °C, 3 RPM, 350 mbar, até que a solução se tornasse concentrada, num volume final de 10 mL.

Fonte: Elaboração da autora

6.6 PREPARAÇÃO DE NANOFORMULAÇÃO PELO MÉTODO DE EMULSÃO DUPLA

O protocolo de emulsão dupla foi testado com o objetivo de verificar se esse método elevaria a %EE. A Tabela 6 mostra a caracterização por DLS das nanopartículas preparadas pelo método de emulsão simples e emulsão dupla.

Tabela 8 - Comparação das nanoformulações preparadas pelos métodos de emulsão simples e dupla quanto às características de %EE, tamanho e PDI

Método	Tamanho (nm)	PDI	%EE
Emulsão dupla	316	0,788	46,3
Emulsão simples	207,8	0,066	10,3

Fonte: Elaboração da autora

O protocolo de emulsão dupla, em comparação com a emulsão simples, aumentou o PDI das nanopartículas produzidas, de 0,066 para 0,788, e o tamanho de 207,8 nm para 316 nm. Além disso, foi observado que a utilização do protocolo de emulsão dupla produziu nanoformulação com maiores %EE (46,3%) que as partículas preparadas por emulsão simples (10,3%). Adicionalmente, o aspecto visual da solução da nanoformulação produzida com os

mesmos insumos descritos anteriormente, no item 5.3, é mostrado do na Figura 8.



Figura 8 - Aspecto visual da solução contendo nanoformulação, método de emulsão dupla. Inicialmente, 50 mg de PLGA foi dissolvido em 5 mL de acetona, sob agitação magnética a 350 rpm, em temperatura ambiente, até total solubilização. Posteriormente, a fase aquosa interna (W1) foi vertida na fase orgânica (O), sob sonicação, com potência de 6 W e ciclo de trabalho constante por 2 min, produzindo assim a emulsão primária W1/O. Em seguida, a fase aquosa externa foi incorporada na W1/O, sob homogeneização turbulenta (Ultra Turrax T25) 10.000 rpm por 5 min, mantidas em banho de gelo e protegidas da luz. Após a formação da emulsão dupla, 10 mL de isopropanol a 2% (v/v) foi adicionado sob agitação magnética e deixado sob agitação magnética overnight para permitir a total evaporação do solvente.

Fonte: Elaboração da autora

Com o objetivo de aumentar a %EE, algumas modificações no protocolo de emulsão dupla foram realizadas, produzindo partículas com maior valor de %EE, próximo a 50%. O aspecto visual da solução contendo as nanopartículas antes e após as modificações realizadas são mostradas na figura 9.

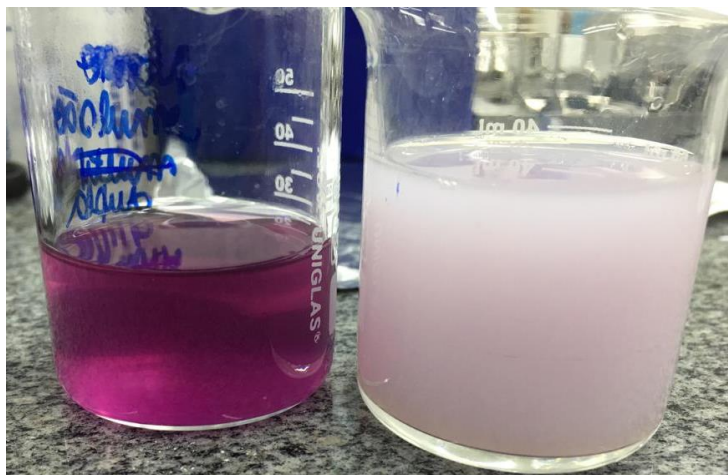


Figura 9 - Comparação das soluções contendo as nanopartículas preparadas pelos métodos de emulsão simples (esquerda) e dupla (direita). Para o preparo de nanopartículas por emulsão simples, 50 mg de PLGA foi dissolvido em 5 mL de acetona sob agitação magnética até total solubilização. Em seguida, a FO foi adicionada em 15 mL de solução aquosa de PEG 8000, sob agitação magnética, à temperatura ambiente e, em seguida, a acetona foi removida da suspensão no rotaevaporador (BUTCHI® R-100), à temperatura de 56 °C (temperatura de ebulição da acetona), 3 RPM, 350 mbar, até que a solução ficasse concentrada a um volume final de 10 mL. Para o preparo de nanopartículas por emulsão dupla, 50 mg de PLGA foi dissolvido em 5 mL de acetona, sob agitação magnética a 350 RPM, à temperatura ambiente, até total solubilização. Posteriormente, a W1 foi vertida na FO utilizando o sonicador com potência de 6 W e ciclo de trabalho constante por 2 min, sob gelo, produzindo a emulsão primária W1/O. Em seguida, a W2 foi incorporada na W1/O sob homogeneização turbulenta (Ultra Turrax T25) 10.000 rpm por 5 min, em banho de gelo e protegidas da luz. Após a formação da emulsão dupla, 10 mL de isopropanol a 2% (v/v) foi adicionado sob agitação magnética e deixado sob agitação overnight para permitir a total evaporação do solvente.

Fonte: Elaboração da autora

O aspecto visual da solução contendo as nanopartículas antes e após as modificações realizadas mostram maior turbidez e homogeneidade na cor da solução contendo as partículas produzidas após as modificações no protocolo, indicando que o encapsulamento do composto foi maior, em comparação ao protocolo utilizado anteriormente.

Em seguida, testamos a influência da variação na quantidade de massa do INH-2 (2 ou 10 mg) sobre a %EE, utilizando o método de emulsão dupla, e os resultados são mostrados na tabela 7.

Tabela 9 – Caracterizações de nanopartículas contendo diferentes massas de INH-2, produzidas por emulsão dupla

Massa de INH-2	Tamanho (nm)	PDI	%EE
2 mg	311,3	0,120	100
10 mg	311,9	0,108	39

Fonte: Elaboração da autora

As nanopartículas produzidas com 2 mg de INH-2 apresentou %EE de 100%, enquanto que, as produzidas utilizando 10 mg, apresentou valor de %EE de 39%.

Fisicamente, as duas formulações apresentaram de tamanho e PDI similares entre si. Esse achado sugere que ocorre saturação da %EE nas nanopartículas, quando utilizamos a maior quantidade de INH-2.

6.7 EFEITO TÓXICO DO INH-2 SOBRE MACRÓFAGOS

Os valores de CC_{50} para $BMM\Phi$ tratados com INH-2 livre e encapsulado foram calculados a partir da determinação da viabilidade celular das células tratadas por diferentes concentrações, após 72 h de exposição (Figura 10).

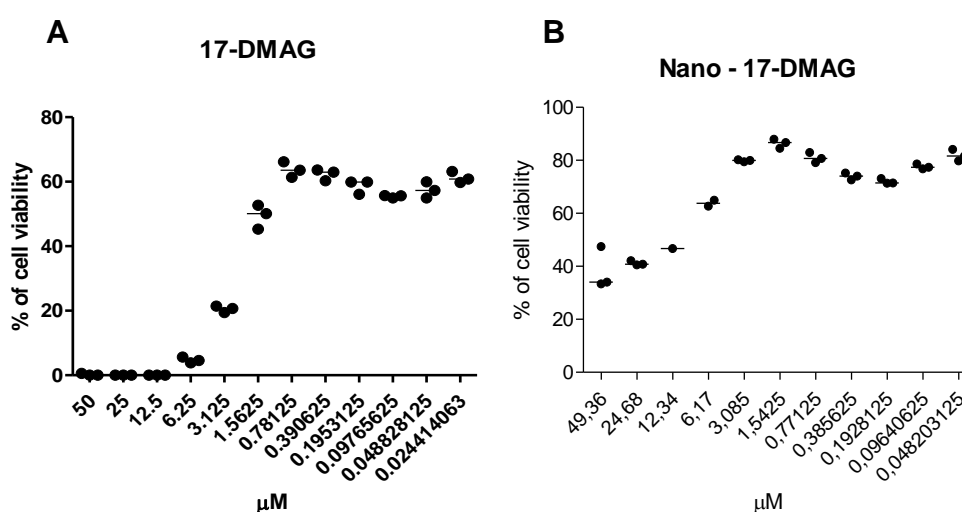


Figura 10 - Viabilidade celular de macrófagos murinos após o tratamento com INH-2. Macrófagos murinos derivados de medula óssea ($BMM\Phi$) foram distribuídos em placas de 96 poços na concentração de 5×10^4 células por poço (200 μ L) e tratadas com concentrações decrescentes diluídas de forma seriada a partir da concentração inicial de 50 μ M e 49,36 μ M do INH-2 livre (A) e em nanoformulação (B), respectivamente. Após esse período, foi acrescentado o corante vital AlamarBlue na concentração final de 10% (v/v) aos poços. Cada ponto corresponde a valores de um experimento representativo de 3 similares, realizados em triplicata e as linhas horizontais representam as medianas dos valores de viabilidade celular.

Fonte: Elaboração da autora

A concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade dos macrófagos foi de 3,2057 μ M para o composto livre e 20,13 μ M para o composto encapsulado. Esses dados demonstram que o INH-2 livre é 6 vezes mais tóxico do que quando se encontra incorporado a nanopartículas.

6.8 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM* COM INH-2

A análise da eficácia do INH-2 livre mostrou que a concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade dos parasitas (IC_{50}), nos tempos de 48 e 72 horas de tratamento foram, respectivamente, de 0,2766 nM (fig. 9A) e 0,3062 nM (fig. 9B). Para o composto

encapsulado, o valor encontrado foi de 17,54 nM (fig. 9C), no tempo de 48 horas de tratamento.

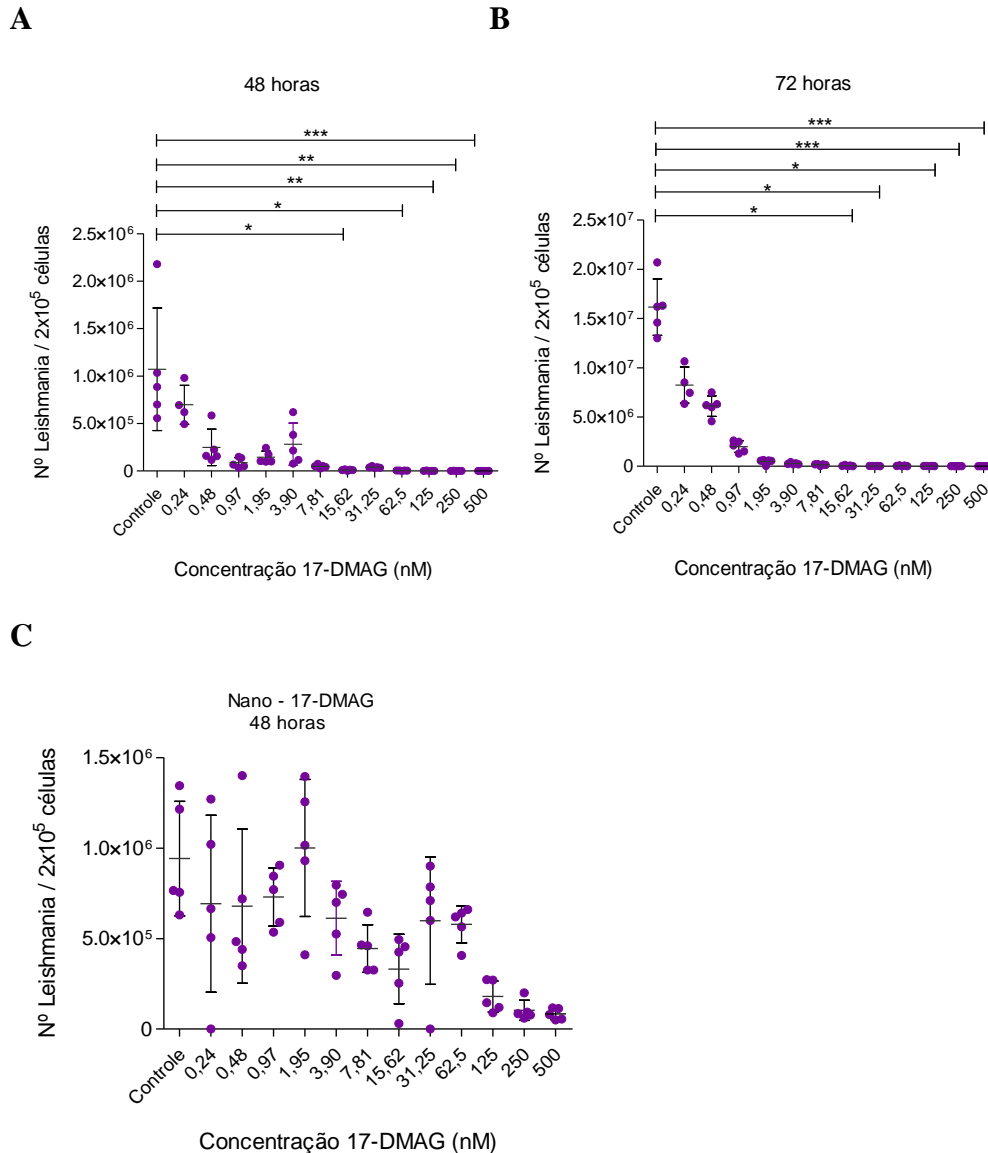


Figura 11 - Determinação da eficácia de INH-2 contra amastigotas de *L. infantum*. BMMØ foram cultivados em RPMI completo em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período, foram infectados com promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária na proporção de 20:1 e mantidos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 24 h de infecção, os macrófagos foram tratados com concentrações diluídas 12 vezes de forma seriada a partir da concentração de 500 nM de INH-2 ou da nanoformulação contendo o composto. Após 48 ou 72 horas, as células foram lavadas 2 vezes com solução salina e incubadas em meio de cultura HOMEM por 12 dias a 24 °C na estufa B.O.D e, assim, permitir a liberação das promastigotas viáveis, que foram então quantificadas por contagem em câmara de Newbauer. Cada ponto corresponde a valores de um experimento realizado em quintuplicata. (A) Eficácia do INH-2 livre após 48h de tratamento; (B) Eficácia do INH-2 livre após 72h de tratamento; (C) Eficácia do INH-2 encapsulado após 48h de tratamento.

Fonte: Elaboração da autora

Os objetivos 3 e 4 propostos, “Determinar o efeito do tratamento com INH-2 sobre a

modulação da resposta imunoinflamatória de macrófagos infectados por *L. infantum*” e “Avaliar o efeito do tratamento com INH-2 sobre a ultraestrutura de *L. infantum* intracelular”, não foram realizados devido a suspensão das atividades no Instituto, causado pela pandemia do novo Coronavírus (SARS-CoV-2). Os mesmos serão realizados no doutorado.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o potencial leishmanicida do INH-2 em modelo *in vitro* no tratamento de macrófagos murinos infectados por *Leishmania infantum*. Para isso, inicialmente, foram produzidos diversos protocolos de nanoformulações, com o objetivo de padronizar um protocolo de produção, que obtivesse valores elevados de %EE para, posteriormente, avaliar comparativamente o efeito do tratamento sobre as células hospedeiras e os parasitos do composto encapsulado comparado ao composto livre.

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), foi utilizada para caracterizar as nanopartículas produzidas, ela permite determinar o tamanho médio, distribuição dos tamanhos e formas das nanopartículas através do movimento browniano e efeito Doppler causado por um feixe de laser (JOHNSON JUNIOR, et al., 1994). A caracterização de nanosistemas é de extrema importância para adequar a formulação produzida com a sua finalidade terapêutica, visto que o tamanho das nanopartículas, bem como o potencial zeta, natureza do polímero podem influenciar na interação da nanopartícula com o organismo.

Nossos primeiros resultados mostraram uma variação de tamanho de 161,6 a 208 nm, índices de polidispersão (PDI) de 0,059 a 0,132 e carga superficial (potencial zeta) de -22,3 a -28,8. De acordo com Formiga et al. (2009), os limites aceitáveis de tamanho para sistemas nanoparticulados deve ser de até 250 nm. No nosso estudo, para confirmar os dados obtidos por DLS, o tamanho médio e distribuição das partículas também foi avaliado por MET. O tamanho das nanopartículas, é uma característica importantíssima quando pensamos na sua interação com a célula hospedeira. Por exemplo, partículas de pequeno tamanho levam menos tempo para permear a mucosa intestinal. Hussain (2001), demonstrou que partículas com diâmetro de 14 nm permeiam o muco intestinal e entram em contato com os enterócitos em apenas 2 minutos. As mesmas partículas, com 415 nm de diâmetro, demoram cerca de 30 minutos, enquanto as partículas com 1000 nm de diâmetro não são capazes de se difundirem pela mucosa. Formiga (2009), mostrou que para que sejam considerados estáveis, as nanopartículas precisam ter um PDI de 0,059 a 0,132 e potencial zeta de -30 a +30 mV. Suas cargas devem ser altas o suficiente para que as nanopartículas não se aglomerem e decantem.

Alguns fatores podem influenciar no potencial zeta, como: pH da substância, a força iônica e apesar de pouco comparado, a concentração, visto que acredita-se que o potencial zeta aumenta conforme aumenta a concentração (BHATTACHARJEE, 2016). Em conjunto, nossos resultados indicam que foram produzidas nanoformulações com boas características para o emprego em sistemas *in vivo*.

Nos primeiros experimentos de produção de nanopartículas, foi utilizado o PCL como polímero, pois o mesmo apresenta algumas vantagens que justificam a sua utilização, como: ser biocompatível, biodegradável e apresentar baixa imunogenicidade, e aumentar a meia vida das moléculas que são encapsuladas. Essas características do PCL permitem que a liberação desses ativos seja mantida de forma mais lenta e que o mesmo permaneça no organismo em circulação por mais tempo. Além disso, o PCL apresenta menor custo que o PLGA, o que facilitaria a sua utilização em larga escala. Apesar dessas diversas vantagens, após a caracterização por DLS, as nanopartículas apresentaram baixíssima %EE, o que justificou a sua substituição pelo PLGA. Este polímero por sua vez, apesar de ficar menos tempo em circulação no organismo, acaba produzindo menos fragmentos cristalinos que podem ser tóxicos, além de ser mais estável que o PCL. A substituição do PCL por PLGA, também pode ser justificada pelo fato de que a sua hidrólise leva à liberação de monômeros de ácido láctico e ácido glicólico, os quais são facilmente metabolizados pelo corpo via ciclo de Krebs (FORMIGA et al., 2009; KUMARI et al., 2010).

Segundo Jain (1998), os nanosistemas precisam possuir as seguintes características principais: manter a estabilidade e atividade do fármaco, baixa polidispersão de tamanho, para que sejam obtidas doses medicamentosas uniformes, perfil de liberação do fármaco reprodutível, para que as nanopartículas apresentem cinética de dissolução semelhante e, principalmente, alta eficiência de encapsulação. Dessa forma, quanto maior for a concentração de fármaco encapsulado, menor será a quantidade de nanopartículas a ser utilizada na sua administração, reduzindo possíveis efeitos tóxicos.

O preparo de nanopartículas poliméricas pode ser feito de diferentes maneiras, porém alguns pontos precisam ser observados, pois podem influenciar diretamente na eficiência de encapsulamento de compostos (REIS et al., 2006). Acreditamos que, a baixa %EE obtida neste protocolo ocorreu devido ao método de nanoprecipitação utilizado para o encapsulamento. Devido à alta solubilidade em água do INH-2, durante a etapa de mistura das fases orgânica e aquosa, a droga não foi totalmente dissolvida no solvente orgânico (acetona) ou durante a etapa de evaporação para retirada do solvente, ela pode ter sido misturada ao solvente, e evaporado junto com ele, não se associando ao polímero e, subsequentemente, não sendo encapsulada.

Devido a isso, trocamos então o método de encapsulamento de nanoprecipitação por emulsão simples e múltipla, a fim de obter uma melhor %EE. As emulsões apresentam diversas vantagens, entre elas: excelente capacidade de liberação controlada, proteção dos agentes encapsulados da degradação, pouca produção de agentes tóxicos decorrente da

degradação do veículo, diminuição da resposta imune indesejada à substância encapsulada, proteção do composto encapsulado contra a inativação ou degradação por fatores endógenos, capacidade de incorporar substâncias ativas com polaridades diferentes, dentre outras (KHAN et al., 2006). Segundo Khan (2006), as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e, por isso, a utilização de emulsão múltipla ao invés de simples, aumenta a estabilidade dos nanopartículas, visto que são introduzidos dois tensoativos, um lipofílico e outro hidrofílico. Essas características da emulsão múltipla garantem uma estabilidade cinética e a manutenção da sua estrutura por um período relativamente longo e tendem a melhorar a %EE.

Outro fator que ajuda a aumentar a %EE dos compostos é a adição de vários aditivos na fase interna aquosa, como alquil sulfonato de sódio, alquil carbonato de sódio, tweens, carbonato de sódio e sorbitol. Esse aumento pode ser atribuído a diminuição da tensão interfacial entre a fase aquosa interna e a fase oleosa da emulsão.

No método de emulsão múltipla utilizado para realização das nanopartículas, além de adicionado alguns dos tensoativos citados, como tweens, também adicionamos um copolímero, PEG, que também contribui para o aumento da estabilidade das nanopartículas e a sua agregação com o PLGA, provocou um pequeno aumento no tamanho das partículas, o que favorece o aumento da EE%.

Mais estudos ainda precisam ser realizados, a fim de melhorar o método de encapsulamento e reprodutibilidade.

Em seguida partimos para avaliar a toxicidade do INH-2 encapsulado sobre macrófagos murinos e a eficácia contra parasitos, por meio da determinação da viabilidade intracelular dos parasitos comparado ao INH-2 livre. Foi demonstrado que, quando encapsulado em nanopartículas, o INH-2 é 6,27 vezes menos tóxico para as células hospedeiras do que quando comparado com a droga livre, com valores de CC_{50} de 3,2057 μM para a droga livre e 20,13 μM para a droga encapsulada. Mellatyar et al. (2014) mostraram que nanopartículas de PLGA-PEG com o INH-2 encapsulado foram mais efetivas em matar células cancerígenas, em comparação com o composto livre. Juntos nossos achados e o da literatura afirmam que a utilização de nanosistemas de liberação controlada de fármacos podem melhorar a eficácia do tratamento. A principal vantagem da utilização dessas formulações seria a redução dos efeitos colaterais, pois possibilita a utilização de uma menor dose do fármaco para garantir a eficácia do tratamento (FORMIGA et al., 2009).

Em estudos anteriores realizados pela equipe, foi demonstrado que o CC_{50} de um análogo do INH-2, o 17-AAG, em macrófagos peritoneais de camundongos CBA foi de 10,8 μM (PETERSEN et al., 2012), enquanto o CC_{50} de células THP-1, foi de 10,6 μM (PALMA

et al., 2019). Esses achados indicam que os macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ), são mais sensíveis ao tratamento com INH-2 livre, sendo necessário o emprego de doses menores para causar efeito tóxico do que para outros tipos celulares. No entanto, o INH-2 encapsulado mostrou ser menos tóxico ($CC_{50} = 20,13 \mu\text{M}$) comparado ao composto livre que mostrou um CC_{50} de $3,2057 \mu\text{M}$, similar ao observado para 17-AAG em lipossomas que apresentou pouca ou nenhuma toxicidade as células hospedeiras (PETERSEN et al., 2018).

Posteriormente, foi determinado o IC_{50} dos parasitas intracelulares após 48 ou 72 horas de tratamento. Não foi observada nenhuma diferença significativa no IC_{50} do INH-2 entre os tempos avaliados, que mostrou valores de $0,3062 \text{ nM}$ para o tempo de 48 horas e de $0,2766 \text{ nM}$ para o tempo de 72 horas, esses achados indicam que o efeito anti-*Leishmania* do INH-2 alcança uma concentração eficaz desde o tempo mais precoce de tratamento. Diferente desse resultado, para o 17-AAG foi demonstrado que o composto reduz significativamente a viabilidade intracelular de parasitos de *L. amazonensis* de forma dose- e tempo-dependentes após 24 e 48 horas de tratamento, em concentrações que variaram de 25 a 500 nM. Além disso, esses dados indicam que os parasitos da espécie *L. infantum* são mais sensíveis ao tratamento com INH-2, visto que doses a partir de $7,81 \text{ nM}$ com valores de IC_{50} em níveis de pentomolar, nos tempos de 48 e 72 horas de tratamento, foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade intracelular desses parasitos (figura 10). Outro estudo realizado pela equipe utilizando a espécie *L. braziliensis*, mostrou que o tratamento com INH-2 livre apresentou o IC_{50} de $16,5 \text{ nM}$, enquanto, quando encapsulada, o valor de IC_{50} foi cerca 2 vezes mais eficaz com valor de IC_{50} de $8,99 \text{ nM}$ (dados não publicados). Esses achados demonstram que é necessária uma menor concentração do composto para reduzir a viabilidade intracelular de *L. infantum* quando comparada com a *L. braziliensis*. Quando o INH-2 encontra-se encapsulado, observamos um valor do IC_{50} de $17,54 \text{ nM}$, no tempo de 48 horas de tratamento. Apesar do IC_{50} do composto encapsulado ser maior do que do composto livre, quando comparamos os índices de seletividade (IS) (razão entre CC_{50} e IC_{50}) do composto encapsulado (IS = $1147,66 \text{ nM}$) e do composto livre (IS = $11589,66$). Esses dados mostram que, o IS do composto encapsulado atinge valores bem elevados, apesar do IS do composto livre ser 10,09 superior do que do composto encapsulado. Dados similares são encontrados na literatura, onde o tratamento com Anfotericina B encapsulado em nanopartículas de Pluronic-F127, foi capaz de reduzir de forma significativa a carga parasitária no fígado e no baço dos animais tratados, mostrando baixa toxicidade para as células hospedeiras, apesar de possuir um IC_{50} maior da droga livre em relação a encapsulada (RIBEIRO, 2014).

Em conjunto, nossos resultados mostram que há uma grande vantagem do encapsulamento do INH-2 em nanopartículas poliméricas, visto que, a sua utilização reduziu a toxicidade do composto para as células hospedeiras. Adicionalmente, considerando as vantagens da utilização de sistemas de liberação controlada, são necessários realizarmos mais estudos para aperfeiçoar os métodos de encapsulamento utilizados na produção das nanopartículas poliméricas e sua reprodutibilidade.

8 CONCLUSÃO

Em conjunto, foi observado que há grande vantagem no encapsulamento do INH-2 em nanopartículas poliméricas, uma vez que, este encapsulamento reduziu a toxicidade do composto para as células hospedeiras e apesar do encapsulamento do composto ter resultado em IC₅₀ superior ao do composto livre, o IS mostrou valores muito elevados, 1147,66 nM do composto livre e 11589,66 nM para o composto encapsulado, mostrando que o composto livre é 10,09 vezes superior ao composto encapsulado. No entanto, os valores de IS são altos o suficiente para virem a ser testados *in vivo*.

Ensaio adicionais precisam ser realizados no intuito de avaliar a eficácia *in vivo* do INH-2 encapsulado em formulação baseada em PLGA, comparada a formulações contendo o composto livre, com o objetivo de padronizar o método de encapsulamento e melhorar sua reprodutibilidade.

REFERÊNCIAS

- AFONSO LCC, SCOTT P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity** 61: 2952-2959, 1993.
- AIALA Salvador, et al. Design and evaluation of surface and adjuvant modified PLGA microspheres for uptake by dendritic cells to improve vaccine responses. **International Journal of Pharmaceutics**, Volume 496, Issue 2, 2015, Pages 371-381.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in Parasitology**, v. 31, p. 175-254, 1999.
- AHN HJ, KIM S, NAM HW. Molecular cloning of the 82-kDa heat shock protein (HSP90) of *Toxoplasma gondii* associated with the entry into and growth in host cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 311: 654-659.
- ALVAR J, YACTAYO S, BERN C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in parasitology* 22: 552-7, 2006b.
- ANTOINE JC, PRINA E, LANG T, COURRET N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in microbiology**, v. 6: 392-401, 1998.
- ANTONIOU T, GOUGH KA. Early-onset pentamidine-associated second degree heart block and sinus bradycardia: case report and review of the literature. **Pharmacotherapy** 25: 899–903, 2005.
- ANTONIOU, T. AND K. A. GOUGH. (2005) Early-onset pentamidine-associated second-degree heart block and sinus bradycardia: case report and review of the literature. **Pharmacotherapy** 25: 899-903.
- ASSAN R, PERRONNE C, ASSAN D, CHOTARD L, MAYAUD C, et al. Pentamidine-induced derangements of glucose homeostasis. Determinant roles of renal failure and drug accumulation. A study of 128 patients. **Diabetes Care** 18: 47–55, 1995.
- BADARÓ, R.; JONES, T. C.; SAMPAIO, D.; REND, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON Jr., W.D. New perspective on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. infect. Dis.**, 154: 1003-11, 1986.
- BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LOURENÇO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON Jr, W. D. A prospective study of visceral leishmaniasis in endemic area of Brazil. **J. infect. Dis.**, 154: 639-49, 1986.
- BANULS AL, HIDE M, PRUGNOLLE F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in parasitology** 64: 1-109, 2007.
- BARRAL, A. et al. Polar and Subpolar Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: Clinical and Immunopathologic Aspects. **International Journal of Dermatology**, v. 34, n. 7, p. 474–

479, 1995.

BARBOSA, Isabelle Ribeiro. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, Rio Grande do Norte, v. 3, n. 1, p. 17-21, 04 mar. 2013.

BEVILACQUA, Paula Dias. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, p. 1-8, nov. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

CAMARGO-NEVES, Vera Lucia Fonseca de; SPÍNOLA, Roberta; LAGE, Lisete. A Leishmaniose Visceral Americana no estado de São Paulo: situação epidemiológica em 2001-2002. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 27-29, 2003.

CHANDRAN, T. et al. Design and evaluation of micellar nanocarriers for 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 392, n. 1-2, p. 170-177, 2010.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. S7-S16, 2007.

CARVALHO, Edgar M.; LESSA, Hélio Andrade; CASTRO, Thomas W. N.; OLIVEIRA, Adja; SCHERIFER, Albert; MACHADO, Paulo; CARVALHO, Edgar M. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, [S.L.], v. 73, n. 6, p. 843-847, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-72992007000600016>.

CARRANZA-TAMAYO, CO et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 396-399, 2010.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

COURRET N, FREHEL C, GOUHIER N, POUCHELET M, PRINA E, et al. Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of cell science* 115: 2303-16, 2002.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*, v. 66, n. 2, p. 827-829, 1998.

DESJEUX P., Leishmaniasis: current situation and new perspectives, *Comparative Immunology. Microbiology & Infectious Diseases* 27. 305-318 2004.

DUQUE, G. A. & DESCOTEAUX, A. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Current opinion in microbiology*. 2015; 26: 32-40.

EGORIN MJ, ZUHOWSKI EG, ROSEN DM, SENTZ DL, COVEY JM, ET AL. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 330507) in CD2F1 mice¹. **Cancer Chemother Pharmacol** 47: 291–302,2001.

ERLEJMAN, M. LAGADARI, J. TONEATTO, G. PIWIEN-PILIPUK, AND M. D. GALIGNIANA, “Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression,” **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1839, no. 2, pp. 71–87, 2014.

FORMIGA, E; ANSORENA, A. E. Nanosistemas a base de poliésteres. Nanotecnología farmacéutica: realidades y posibilidades farmacoterapéuticas., p. 41–101, 2009

FAYE, B. et al. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in a rural area of Senegal: analysis of risk factors involved in transmission to humans. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 6, p. 333-340, 2011.

FAYE, B. et al. Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: risk of emergence in humans? **Microbes and Infection**, Paris, v. 12, p. 1219-1225, 2010.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 3, n. 2, 2015.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 338-349, set. 2004. FapUNIFESP (SciELO).

HAMIDI M, AZADI A, RAFIEI P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*;60:1638-49, 2008.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, p. 324–332, 2011

HOMBACH, A.; CLOS, J. No stress – Hsp90 and signal transduction in *Leishmania*. **Parasitology**, v. 141, n. 9, p. 1156–1166, 2014.

ISAACS, J. S.; XU, W.; NECKERS, L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. **Cancer Cell**, v. 3, p. 213-217, 2002.

JOSE MARIO BARICHELLO, et al. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 25:4, 471-476, 1999.

KARIMBIL, Sujith Kumar; KUMARI, Sobhana; CELINE, Machiyanickel Isac; JOY, Augustine. A chronic mutilating rhinopathy with a delayed diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 426-429, abr. 2010. Wiley.

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

KILLICK KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 66 Suppl 1, p. 71-74, 1991.

KONIORDOU, M. et al. Snapshot profiling of the antileishmanial potency of lead compounds and drug candidates against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes, with a focus on human-derived host cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 1–7, 2017.

LI, Q. et al. A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, v. 7, n. 6, p. 122, 2017.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, n. 1, p. 84-95, 1912.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARZOCHI, Mauro Célio de A. **Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil**. Revisão das Investigações Realizadas Pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, p. 432-446, out. 1985.

MCGWIRE BS, SATOSKAR AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM : monthly journal of the Association of Physicians** 107: 7-14,2014.

MENEZES, Juliana Perrone Bezerra de; GUEDES, Carlos Eduardo Sampaio; PETERSEN, Antônio Luis de Oliveira Almeida; FRAGA, Deborah Bittencourt Mothé; VERAS, Patrícia Sampaio Tavares. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2015, p. 1-11, 2015. Hindawi Limited.

MORAES, A., TAVARES, G., ROCHA, F., PAULA, E., GIORGIO, S., Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. **Experimental Parasitology**, 2018.

PAVITHRA SR, KUMAR R, TATU U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Comput Biol* 2007; 3: 1701-1715.

PETERSEN, Antonio Luis de Oliveira Almeida et al. Encapsulation of the HSP-90 Chaperone Inhibitor 17-AAG in Stable Liposome Allow Increasing the Therapeutic Index as Assessed, in vitro, on *Leishmania (L) amazonensis* Amastigotes-Hosted in Mouse CBA Macrophages. **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 8, p. 303-317, 30 ago. 2018. Frontiers Media SA.

PETERSEN, A. L. DE O. A. et al. 17-AAG Kills Intracellular *Leishmania amazonensis* while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–12,

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral

leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

PRATT AND D. O. TOFT, "Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery," **Experimental Biology and Medicine**, vol. 228, no. 2, pp. 111–133, 2003.

PRODROMOU C, ROE SM, O'BRIEN R, LADBURY JE, PIPER PW, PEARL LH. Identification and structural characterization of the ATP/ADPbinding site in the Hsp90 molecular chaperone. **Cell** 1997; 90: 65- 75, 2012.

SANTOS, D. M. et al. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3275, 2014.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis.[Erratum appears in Trop Med Int Health 2002 Mar;7(3):293]. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.

SUNDAR, S. et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 4, p. 1104–1107, 2000.

SHERLOCK, Ítalo A. **Interações ecológicas da leishmaniose visceral no estado da Bahia, Brasil**. 1997. 211 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Parasitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1997.

SOUSA-GOMES, Marcia Leite de et al. Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 519-526, dez. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742011000400011>.

STEBBINS, C.E.; RUSSO, A.A.; SCHNEIDER, C.; ROSEN, N; HARTL, F.U; PAVLETICH, N. P. Crystal structure of an Hsp90 – geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. **Cell**, v. 89, n.2, p.239-250,1997.

VENKETESH, R. S. et al Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **J Biol Chem** 2010; 285: 37964-37975.

WHITESSELL L, MIMNAUGH EG, DE COSTA B, MYERS CE, NECKERS LM. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91: 8324-8328.

WANG, C. C. Validating targets for antiparasite chemotherapy. **Parasitology**, v. 114, p. S31-S44, 1997.