

Maiara Maria Romaneli Silva

Estudo pré-clínico da sertralina nanolipossomal na leishmaniose visceral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

Co-orientadora: Dra. Thais Alves da Costa Silva

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Maiara Maria Romaneli.

Estudo pré-clínico da sertralina nanolipossomal na leishmaniose visceral. – 2018.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

1. Leishmaniose visceral. 2. Terapia biológica. 3. Reposicionamento de fármacos. 4. Sertralina.

SES/CCD/CD-363/2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao Instituto Adolfo Lutz por toda estrutura e suporte para que esse trabalho tenha sido realizado, ao Programa de Mestrado da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo pela oportunidade e credibilidade conferidas a mim para que o realizasse e à CAPES pelo auxílio financeiro durante o programa.

Agradeço ao meu orientador Prof^o. Dr^o. André Tempone por permitir que eu realizasse esse trabalho abrindo as portas de seu laboratório. Muito obrigada por todo conhecimento compartilhado, todo apoio, confiança e auxílio do início ao fim do trabalho.

À Thais que aceitou me co-orientar. Obrigada por sempre me ajudar, compartilhando seus conhecimentos. Obrigada também pelas nossas conversas informais.

Aos técnicos Matília e Vicente, obrigada por todo o suporte prestado durante minha estada no laboratório.

As amigas do laboratório Marta, Mariana, Maiara Amaral, Paola, Ingrid, Alle, Valéria e Marta Marques, obrigada pela paciência, companheirismo e pelos momentos de descontração. Em especial à Daiane e Juliana, obrigada por me acompanharem nos tratamentos animais aos fins de semana e por me ensinarem tudo o que sabiam. Muito obrigada pelo apoio nos momentos difíceis, risadas compartilhadas, imensa parceria e amizade, sem vocês esse trabalho não teria acontecido.

Aos meus pais, Leda e Laércio, e meus irmãos Liana, Telma e Tiago que me guiaram até aqui e acreditaram em mim, todo meu amor e gratidão. Obrigada por terem acreditado no meu sonho e tornado ele possível de ser alcançado, amo muito vocês.

Aos meus amigos pela paciência e apoio durante esse tempo em que estive ausente me dedicando exclusivamente ao trabalho.

Ao meu namorado Kelvin Koki pelo incentivo, paciência e companheirismo durante a realização desse projeto.

Aos amigos do Centro de Patologia, Juliana Guerra, Juliana Takahashi, Lidia, Leonardo, Karen, Ana Lúcia, Fernanda, Regina, Telma, Marilena e Cristiane, que sempre me apoiaram e me incentivaram.

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

Resumo

A leishmaniose visceral (LV) é uma protozoose negligenciada fatal se não tratada, afetando 1,5 milhões de pessoas em todo o mundo. Na América Latina, o Brasil é responsável por 90% dos casos de LV, sendo seu tratamento um grande desafio, por apresentar alta toxicidade. Desta forma, a busca por alternativas terapêuticas é uma necessidade iminente. O reposicionamento de fármacos vem sendo uma abordagem importante na redução do custo e do tempo nas pesquisas. Além disso, sistemas de entrega de fármacos (*Drug Delivery*) como lipossomos, têm contribuído para a redução de dose terapêutica e conseqüentemente, dos efeitos adversos dos fármacos. Sendo assim, neste trabalho, foi avaliado o potencial anti-*Leishmania* do antidepressivo sertralina (SERT) em modelos *in vitro* e *in vivo*, utilizando tanto o fármaco livre (SERT), como encapsulado em nanolipossomos (SERT-LP). A SERT apresentou atividade contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares com valores de Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) de 0,7 µM e 4 µM, respectivamente. A associação *in vitro* da SERT com miltefosina demonstrou valores da média das somatórias das Concentrações Inibitórias Fracionárias (X_ΣCIF) de 0,64 e 1,32 em promastigotas e amastigotas, respectivamente, resultando em uma associação aditiva. Visando verificar a eficácia *in vivo*, foi realizado um estudo farmacocinético da SERT em modelo murino, resultando em uma meia vida plasmática (T_{1/2}) de aproximadamente 8 horas. O estudo *in vivo* da eficácia da SERT demonstrou falha terapêutica, tanto na administração pela via oral, como subcutânea. Porém, quando encapsulada em lipossomos (125 nm) de carga negativa, resultou em uma significativa redução (89%) da carga parasitária no fígado de camundongos tratados, pela via de administração subcutânea, por 10 dias a 1 mg/kg/dia. Inesperadamente, em uma dose 15 vezes maior, foi observado um aumento de 100% da carga parasitária, valor este, correlacionado ao aumento dos níveis séricos da citocina IL-6 e da quimiocina MCP-1. Estudos de biodistribuição da SERT-LP, demonstraram a presença da formulação no fígado e baço - 12 a 48 horas após administração subcutânea. Estudos histopatológicos dos animais tratados a 1 e 15 mg/kg/dia por 10 dias demonstraram a presença de múltiplos

focos de infiltrado inflamatório linfocitário, formando esboços granulomatosos, em parênquima hepático. No baço, foi observado a presença de hiperplasia linfóide reativa, não diferindo do grupo controle. Os dados obtidos no estudo histopatológico corroboram os níveis de citocinas observados por citometria de fluxo, resultando em um infiltrado inflamatório. O presente estudo demonstra a eficácia da sertralina encapsulada em lipossomos na LV experimental, e sugere pela primeira vez, uma correlação entre o aumento da carga parasitária com a imunomodulação dose-dependente do fármaco.

Palavras chave: *Leishmania*, fármacos, reposicionamento de fármacos, modelos experimentais, sertralina.

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is a fatal neglected protozoan, affecting 1.5 million people in all the world. In Latin America, Brazil is responsible for 90% of cases of VL, and its treatment is a challenge once it shows high toxicity. That's why it's important to search for therapeutic alternatives. Drug repositioning has been an important approach in reducing cost and time for the research. In addition, controlled drug delivery systems such as liposomes have contributed to the reduction of the therapeutic dose and, consequently, to the adverse effects of the drugs. In this study, the anti-Leishmania potential of sertraline antidepressant (SERT) was evaluated in *in vitro* and *in vivo* models, using the free drug (SERT) and the encapsulated in nanoliposomes (SERT-LP). SERT showed a potent activity against promastigotes and intracellular amastigotes with concentrations of 50% Effective Concentration (EC_{50}) of 0.7 μ M and 4 μ M, respectively. The *in vitro* association of SERT with miltefosine demonstrated mean values of the sum of Fractional Inhibitory Concentrations (Σ CIF) of 0.64 and 1.32 in promastigotes and amastigotes, respectively, resulting in an additive association. Aiming for *in vivo* efficacy studies, a pharmacokinetic study of free sertraline in the murine model was performed, resulting in a plasma half-life ($T_{1/2}$) of approximately 8 hours. *In vivo* study of the efficacy of SERT demonstrated therapeutic failure, in oral and subcutaneous administration. However, when encapsulated in nanoliposomes (125 nm) charge negatively (SERT-LP), it resulted in a significant reduction (89%) of the parasite burden in the liver of mice treated for 10 days at 1 mg/kg. Unexpectedly, at a dose 15 times higher, showed 100% of increase in the parasite burden, which was correlated with increased levels of cytokine IL-6 and chemokine MCP-1. Studies of biodistribution of SERT-LP, demonstrated the presence of the formulation in liver and spleen - 12 to 48 hours after subcutaneous administration. Histopathological studies of animals treated at 1 and 15 mg/kg for 10 days showed the presence of multiple foci of inflammatory lymphohistiocytic infiltrate, forming granulomatous sketches in hepatic parenchyma. In the spleen, the presence of reactive lymphoid hyperplasia was observed, not differing from the control group. The data obtained in the histopathological study corroborate v

the levels of cytokines observed in the flow cytometry, resulting in an inflammatory infiltrate. The present study demonstrates the potential of this new sertraline nanoformulation in experimental LV and suggests for the first time a correlation between increased parasite burden with dose-dependent immunomodulation of the drug.

Key Words: *Leishmania*, drugs, therapy, repositioning, *in vivo*

Lista de Abreviaturas

Σ CIF: somatória da concentração inibição fracionária

5-HT1A: receptor da serotonina

ATCC CCL: American Type Culture Collection

AUC: area under the curve

B.O.D: estufa com demanda bioquímica de oxigênio

CBA: cytometric beads array

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CE₅₀: Concentração efetiva 50%

CIF: concentração inibitória fracionária

CLAE: cromatográfica líquida de alta eficiência

CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

C_{max}: concentração plasmática máxima

CO₂: dióxido de carbônico

D.P.I.: dias pós infecção

DIL C18: fluoróforo de membrana lipofílico

DLS: dispersão de luz dinâmica

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNDi: Drugs for Neglected Diseases

EE: Eficácia de encapsulação

FDA: Food and Drug Administration

I.P.: via intraperitoneal

I.S.: índice de seletividade

IFN- γ : Interferon gama

IL10: Interleucina 10

IL12: Interleucina 12

IL4: interleucina 4

IL6: Interleucina 6

ISRS: inibidor seletivo de recaptura de serotonina

LUV: Vesícula unilamelar grande

LV: Leishmaniose visceral

LVC: Leishmaniose visceral canina

MCP1: monocyte chemoattractant protein-1

MIL: miltefosina

MLV: Vesícula multilamenar

MS: Ministério da Saúde

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NaN₃: azida sódica

NK: células natural killer

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: tampão fosfato salino

Sb^v: antimoniais pentavalentes

SC: via subcutânea

SDS: dodecil sulfato de sódio

SERT - LP: sertralina lipossomal

SERT: sertralina

SERT-LP-R123: sertralina lipossomal com sonda fluorescente Rodamina 123

SFB: Soro fetal bovino

SR: receptores scavenger

SUV: Vesícula unilamelar pequena

T_{1/2}: tempo de meia vida plasmática

TFA: ácido trifluoroacético

Th0: Linfócitos T inativos

Th1: Linfócitos T helper tipo 1

Th2: Linfócitos T helper tipo 2

TNF: Fator de necrose tumoral

VO: via oral

χ^2 CIF: Média da somatória da concentração inibitória fracionária

Lista de Figuras

- Figura 1:** Fêmea de Flebotomíneo adulto. Fonte: Ministério da Saúde, 2006. 20
- Figura 2:** Evolução do número de casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2015. Fonte: Ministério da Saúde, 2017..... 21
- Figura 3:** Taxa de letalidade da LV no Brasil nos anos de 2006 a 2015. Fonte: Ministério da Saúde, 2017..... 22
- Figura 4:** Casos de LV por município no Brasil no ano de 2015. Cada ponto simboliza um ponto de leishmaniose visceral. Fonte: Ministério da Saúde, 2017. 22
- Figura 5:** *Leishmania* (L.) *infantum* causadora da LV- (A) Formas promastigotas, extracelular, flagelada, possui tamanho de 12 a 20µm. (B) Formas amastigotas, intracelular, possui tamanho de 2 a 4 µm. Fonte: Arquivo pessoal..... 23
- Figura 6:** Ciclo biológico *Leishmania* ssp. Fonte: CDC, 2013 (modificado)..... 23
- Figura 7:** Etapas do desenvolvimento de novos fármacos e reposicionamento de fármacos. Fonte: Ashburn, 2004. 32
- Figura 8:** Estrutura química da sertralina. Fonte: DrugBank..... 33
- Figura 9:** Esquema ilustrativo de um lipossomo podendo conter fármacos hidrofílicos (cavidade interna) ou fármacos lipofílicos (retido na bicamada lipídica). Fonte: Pimentel, 2007..... 36
- Figura 10:** Esquema de classificação dos lipossomos.MLV -Vesícula multilamellar (100 a 1000 nm); LUV - vesícula unilamellar grande (1000 nm), SUV - vesícula unilamellar pequena (25nm)..... 37
- Figura 11:** Isoblograma representativo de associações antagônicas (valor da média da somatória da concentração fracionária inibitória menor que 0,5), aditivas (valores da média da somatória da concentração fracionária inibitória entre <0,5 e >4) e sinérgicas (valores da média da somatória da concentração fracionária inibitória acima de 4).....

Figura 12: Curvas de dose resposta entre a associação de sertralina e miltefosina, na forma promastigota de <i>Leishmania (L.) infantum</i> . As concentrações estão representadas em μM . Figura representativa de um experimento.....	58
Figura 13: Isoblograma gerado a partir da associação entre miltefosina e sertralina na forma promastigota de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	60
Figura 14: Curvas de dose resposta entre a associação de sertralina e miltefosina, na forma amastigota intracelular de <i>Leishmania (L.) infantum</i> . As concentrações estão representadas em μM . Figura representativa de um experimento.....	61
Figura 15: Isoblograma gerado a partir da associação entre miltefosina e sertralina na forma amastigota de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	63
Figura 16: Curva de concentração de sertralina diluída em isopropanol (1.56–100 $\mu\text{g/mL}$) quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)..	64
Figura 17: Cromatograma da sertralina livre (A) e lipossomal (B) obtido a 220 nm em CLAE. A corrida foi desenvolvida na presença de metanol (0,01% TFA) em água (0,01% TFA), utilizando coluna C4. O volume de injeção de foi 20 μL , com uma vazão de 1 mL/min, totalizando um tempo de corrida de 26 minutos. O sinal da sertralina (pico) pode ser observado com tempo de retenção de 11,8 min (seta preta).	65
Figura 18: Captação de SERT-LP-R123 por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não por <i>Leishmania (L.) infantum</i> . A intensidade da fluorescência expressa por unidades arbitrárias de fluorescência dentro dos macrófagos foi dosada por citometria de fluxo (Attune-Thermofisher) em um total de 270 minutos, utilizando 10.000 eventos para cada tempo (preto - macrófagos não infectados; vermelho- macrófagos infectados).	66
Figura 19: Estudo farmacocinético da sertralina livre (15 mg/kg) em modelo murino, administrada a 15 mg/kg. Análise realizada em CLAE-EM.	

Figura 20: Carga parasitária de *Leishmania* (L.) *infantum* no fígado de camundongos BALB/c após 15 dias de tratamento com a sertralina livre pela via de administração oral. 69

Figura 21: Carga parasitária de *Leishmania* (L.) *infantum* no fígado de camundongos BALB/c após 15 dias de tratamento com a sertralina livre pela via de administração subcutânea. 71

Figura 22: Carga parasitária de *Leishmania* (L.) *infantum* no fígado de camundongos BALB/c após 15 dias de tratamento com a SERT - LP pela via de administração subcutânea * $p < 0,05$ **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23: Avaliação dos níveis séricos da citocina IL-6 (A) e da quimiocina MCP-1 (B) em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania* (L.) *infantum* e tratados por 10 dias consecutivos com SERT-LP nas doses de 1 e 15 mg/kg. Os níveis de citocinas (pg/mL) foram determinados por citometria de fluxo pelo kit CBA (*cytometric beads array*). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). Foram considerados 10.000 eventos por análise. 72

Figura 24: Avaliação histopatológica de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*, após 10 dias consecutivos de tratamento com sertralina lipossomal. A- Imagem representativa do fígado do grupo controle não tratado. Setas- múltiplos focos de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, formando esboços granulomatosos, em parênquima hepático. Coloração de H&E. Aumento de 100x. Em detalhe, observa-se foco de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário em parênquima hepático. Coloração de H&E. Aumento de 400x. B- Imagem representativo de um baço do grupo controle não tratado. Setas- presença de hiperplasia linfóide reativa. Coloração de H&E. Aumento de 100x. C- Imagem representativa do fígado do grupo tratado à 1 mg/kg. Setas- diversos focos de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, formando esboços granulomatosos, em parênquima hepático (seta). D- Imagem representativa do baço do grupo tratado à 1 mg/kg. Presença de hiperplasia linfóide reativa. Coloração de H&E. Aumento de 100x. Em detalhe, observa-se espler neutrofílica, discreta. Coloração H&E. Aumento 400x. E- Imag...

representativa do fígado do grupo tratado à 15 mg/kg. Presença de múltiplos focos aleatórios de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, formando esboços granulomatosos, em parênquima hepático. Coloração H&E. Aumento de 100x. F- Imagem representativa do baço do grupo tratado à 15 mg/kg. Presença de hiperplasia linfóide reativa. Coloração H&E. Aumento 100x. G - Imagem representativa do fígado de um animal não tratado e não infectado. Fígado com aspecto normal, apresentando hepatócitos e cordões de células. Coloração H&E. Aumento de 100x. H- Imagem representativa do baço de um animal não tratado e não infectado. Baço apresentando aspectos normais, com polpa branca, polpa vermelha em tamanhos esperados. Coloração H&E. Aumento 100x. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25: Fotos representativas de imprint de baço adquiridas em microscópio de fluorescência. Distribuição de lipossomos (seta) marcados com DIL C18 contendo sertralina em baço de camundongo BALB/c. Dez dias após a infecção, os animais foram tratados com SERT-LP, e tiveram o baço e fígado removidos, realizados imprinting de cada órgão e as amostras submetidas à análises de imunofluorescência. Células nucleadas marcadas com DAPI (azul). Lipossomos marcados com DIL C18 (vermelho). A: 0 hora de tratamento. B: 12 horas de tratamento. 79

Figura 26: Fotos representativas de imprint de baço adquiridas em microscópio de fluorescência. Distribuição de lipossomos (seta) marcados com DIL C18 contendo sertralina em baço de camundongo BALB/c. Dez dias após a infecção, os animais foram tratados com SERT-LP, e tiveram o baço e fígado removidos, realizados imprinting de cada órgão e as amostras submetidas à análises de imunofluorescência. Células nucleadas marcadas com DAPI (azul). Lipossomos marcados com DIL C18 (vermelho). C: 24 horas de tratamento. D: 48 horas de tratamento. **Erro! Indicador não definido.**

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tabela de conversão de doses de animais para doses equivalentes à humanos, baseados na área de superfície corporal (ASC):.....	51
Tabela 2: Valores das Concentrações efetivas 50% (CE ₅₀) dos fármacos estudados contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>Leishmania (L.) infantum</i> , citotoxicidade em células de mamífero (NCTC).....	57
Tabela 3: Valores de CE ₅₀ , CIF e Σ CIF gerados pela associação entre sertralina e miltefosina em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> (MHOM/MA67ITMAP263) sertralina e miltefosina em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	59
Tabela 4: Valores de CE ₅₀ , CIF e Σ CIF gerados pela associação entre sertralina e miltefosina em amastigota intracelular de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	62

Índice

1.1. Leishmanioses	20
1.2. Leishmaniose Visceral (LV).....	21
1.2.1. Epidemiologia.....	21
1.2.2. Ciclo Biológico.....	22
1.2.3. Patogenia da leishmaniose visceral	24
1.2.1. Relação Patógeno – Hospedeiro: Resposta Imune na Leishmaniose Visceral	25
1.2.2. Tratamento Atual da Leishmaniose visceral.....	27
a) Antimoniais Pentavalentes.....	27
b) Anfotericina B.....	28
c) Anfotericina B: Formulações Lipídicas e Lipossomal	28
d) Pentamidina	29
e) Paromomicina	29
f) Miltefosina.....	30
1.3. Reposicionamento de fármacos	31
1.4. Sertralina.....	33
1.5. Farmacocinética	34
1.6. Lipossomos	35
1.7. Associação de fármacos	38
Justificativa.....	40
2. Objetivos	40
3. Material e Métodos.....	42
3.1. Reagentes.....	42
3.2. <i>Leishmania (L.) infantum</i>	42
3.3. NCTC	42
3.4. Células de mamíferos	Erro! Indicador não definido.
3.5. Animais de experimentação	43
3.6. Lipossomo	44

3.6.1. Preparo da sertralina lipossomal	44
3.6.2. Quantificação de sertralina nos lipossomos	44
3.6.3 Avaliação do diâmetro e carga dos lipossomos	45
3.7. Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) dos fármacos estudados.....	45
3.7.1. Promastigotas	45
3.7.2. Amastigotas.....	46
3.8. Determinação <i>in vitro</i> da concentração citotóxica 50% (CC ₅₀) frente a células de mamíferos e determinação do índice de seletividade (IS).....	47
3.9. Determinação <i>in vitro</i> da associação entre SERT e MIL	47
3.10. Captação <i>in vitro</i> da SERT-LP por macrófagos.....	48
3.11. Ensaio <i>in vivo</i>	50
3.11.1. Avaliação da efetividade de SERT em diferentes vias em camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	50
3.11.2. Avaliação da Farmacocinética em Modelo Murino:	51
3.11.3. Esquema de tratamento:	52
3.11.3.1. Avaliação da efetividade do tratamento com SERT livre pela via oral em camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	52
3.11.3.2. Avaliação da efetividade do tratamento com SERT livre pela via subcutânea em camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	52
3.11.3.3. Avaliação da efetividade do tratamento com SERT-LP pela via subcutânea em camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	53
3.12. Determinação da carga parasitária por diluição limitante	53
3.13. Determinação da reposta imune	54
3.14. Estudo do perfil histopatológico.....	54
3.15. Biodistribuição da SERT-LP	55
3.16. Análises estatísticas	55
4. Resultados	56
4.1. Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) da SERT	56
4.2. Determinação <i>in vitro</i> da associação entre sertralina e miltefosina.....	57

4.2.1. Promastigota	57
4.2.2. Amastigota	60
4.3. Avaliação do diâmetro, carga dos lipossomos e eficiência de encapsulação	63
4.4. Eficiência de Encapsulação (%EE): Quantificação da SERT nos lipossomos.	64
4.5. Avaliação <i>in vitro</i> da internalização do SERT-LP marcado com Rodamina 123 em macrófagos peritoneais.	66
4.6. Estudos de Farmacocinética (PK)	67
4.7. Avaliação <i>in vivo</i> da eficácia da SERT pela via de administração oral.....	68
4.8. Avaliação <i>in vivo</i> da eficácia SERT – LP pela via de administração subcutânea.....	69
4.9. Avaliação <i>in vivo</i> da eficácia da SERT livre pela via administração subcutânea.....	70
4.10. Determinação da resposta celular.....	71
4.11. Perfil Histopatológico:.....	73
5. Discussão.....	83
6. Conclusões.....	91
7. Bibliografia.....	93

1. Introdução

1.1. Leishmanioses

Leishmanioses são um complexo de doenças (tropical e subtropical), causadas por protozoários intracelulares denominados *Leishmania* spp, que são transmitidos para os humanos a partir do repasto sanguíneo da fêmea do mosquito *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomya* (Figura 1), no Novo Mundo (Hailu, 2016; Torres-Guerrero, 2017). Existem mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* pertencentes à família Tripanosomatidae (ordem Kinetoplastida). As leishmanioses afetam 12 milhões de pessoas no mundo estão presentes na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017).



Figura 1: Fêmea de flebotomíneo adulto. Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

No Brasil existem três principais espécies causadoras da leishmaniose tegumentar: (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) guyanensis*) e uma única causadora da leishmaniose visceral (*Leishmania (L.) infantum*) (Iniguez, 2015). Juntas, as leishmanioses representam um grave problema para a saúde pública no Brasil e no mundo. Essa doença ocorre nas Américas, África, Ásia e Europa, sendo que no continente americano há relatos da doença desde a época colonial (Bush et al, 2017; Uliana et al 2017). A OMS estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de serem infectadas pela *Leishmania* spp. Somente na América Latina, é estimado que ocorram 60.000 novos casos por ano (Torres-Guerrero, 2017). Atualmente, a

doença afeta 98 países localizados principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde mudanças climáticas e econômicas influenciam o controle da doença (Aksoy et al., 2015).

1.2. Leishmaniose Visceral (LV)

1.2.1. Epidemiologia

A LV é uma antroponose causada pela *Leishmania* (L.) *donovani* na Ásia e na África, e uma antropozoonose causada pela *Leishmania* (L.) *infantum* nas Américas e no Mediterrâneo (Hailu, 2016).

Segundo a OMS, a LV é altamente endêmica no subcontinente Indiano e no leste da África. São estimados que 200.000 a 400.000 novos casos de LV ocorram no mundo todo, a cada ano. Mais de 90% desses novos casos ocorrem em países como Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul. Estes números são subestimados uma vez que não são todos os países que fazem a devida notificação em um sistema de armazenamento de dados (Alvar et al, 2012; OMS, 2014).

Mesmo com grande parte dos casos de leishmaniose visceral americana (LVA) subnotificados, o Brasil é responsável por cerca de 90% dos casos na América Latina. Somente em 2012 foram notificados 3.038 casos da doença em humanos, com incidência de 1,57 casos/100.000 habitantes, e esses números vem aumentando (Figura 2 e 3). A região nordeste é a que vem sendo mais afetada pela doença (Figura 4). As crianças são as mais acometidas, compreendendo 41,9% dos casos humanos no país (Marcondes, 2013).

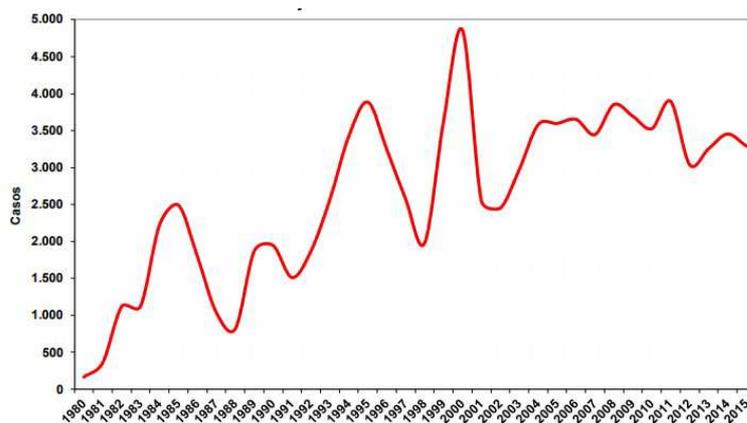


Figura 2: Figura 3: Evolução do número de casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2015. Fonte: Ministério da Saúde, 2017

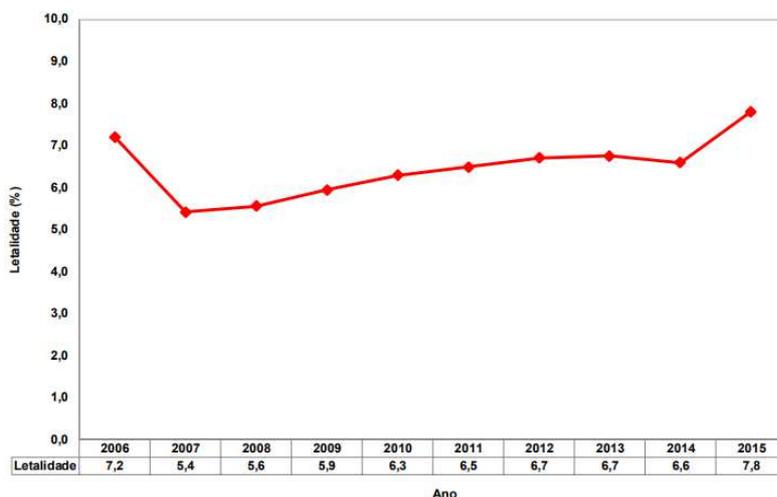


Figura 4: Taxa de letalidade da LV no Brasil nos anos de 2006 a 2015. Fonte: Ministério da Saúde, 2017.



Figura 5: Casos de LV por município no Brasil no ano de 2015. Cada ponto simboliza um caso de leishmaniose visceral. Fonte: Ministério da Saúde, 2017.

1.2.2. Ciclo Biológico

No Brasil, a LV é causada pelo protozoário *Leishmania (L.) infantum*. Seu ciclo apresenta dois estágios: a forma promastigota (Figura 5A), flagelada, é encontrada no tubo digestório da fêmea do flebotomíneo, que ao realizar o repasto sanguíneo regurgita as formas infectantes (promastigotas metacíclicas) pela sua probóscida. As formas promastigotas, no hospedeiro mamífero, são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células mononucleares fagocíticas e se transformam em amastigotas (Figura 5B) intracelulares, que se multiplicam por divisão binária, rompendo as células infectadas e infectando novas células. A fêmea do flebotomíneo, ao ingerir sangue de um indivíduo

previamente infectado, ingere macrófagos com amastigotas que se transformam em promastigotas no intestino do vetor e migram para a probóscida, podendo assim infectar novos hospedeiros (Figura 6) (CDC, 2013; Tonin, 2015).

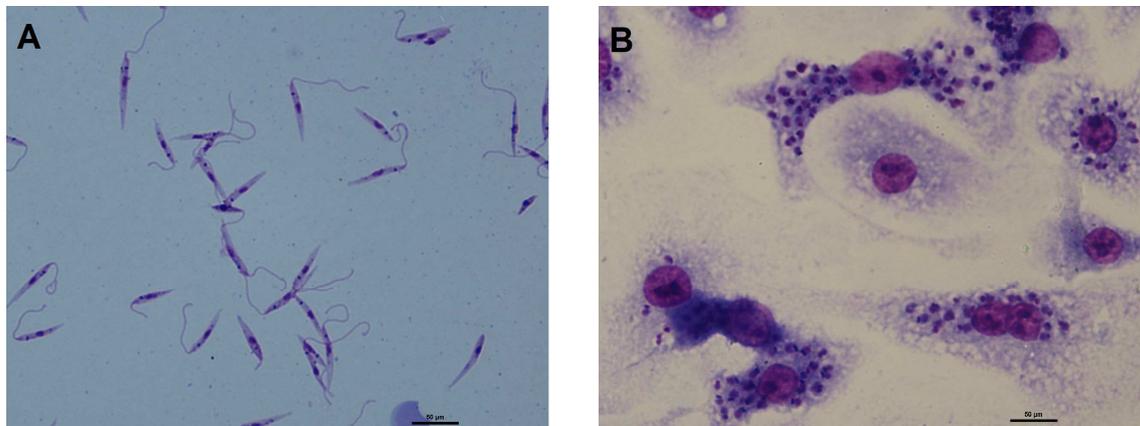


Figura 6: *Leishmania* (L.) *infantum* agente etiológico da LV- (A) Formas promastigotas, extracelulares, flageladas, possuem tamanho de 12 a 20µm. (B) Formas amastigotas, intracelulares, possuem tamanho de 2 a 4 µm. Escala: 10 µm. Fonte: Arquivo pessoal.

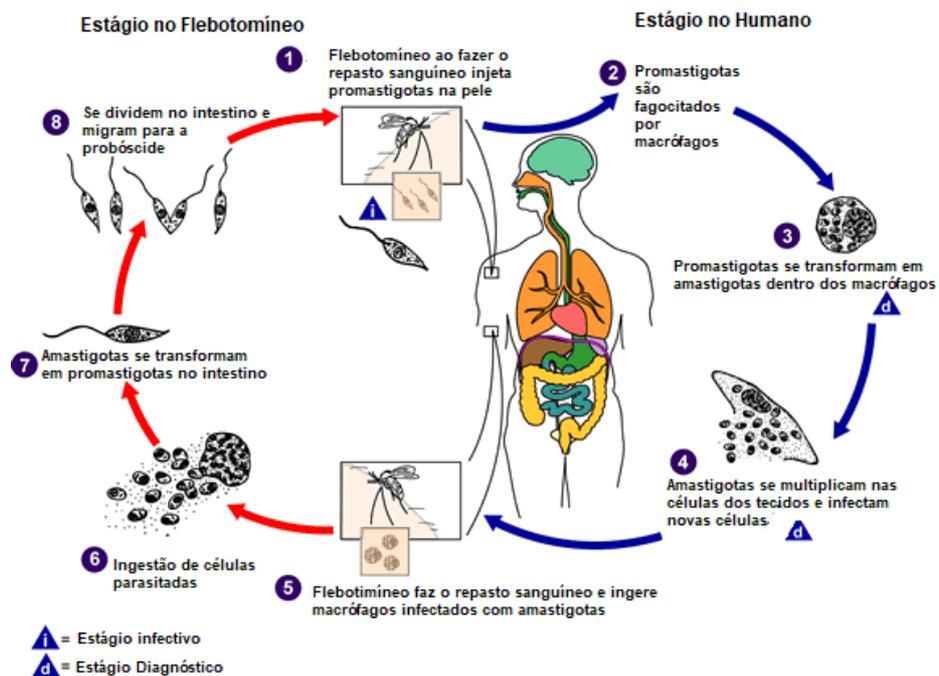


Figura 7: Ciclo biológico *Leishmania* ssp. Fonte: CDC, 2013 (modificado).

Para a manutenção do ciclo, o parasita necessita de um reservatório. Neste contexto, o reservatório pode se dar por duas formas: antroponótica: em que o hospedeiro é o próprio homem; e a zoonótica: em que o reservatório é o cão, em ambientes domésticos, e no ambiente silvestre são os canídeos, marsupiais e raposas (Alvar, 2004; WHO, 2010; Babuadze, 2014).

1.2.3. Patogenia da leishmaniose visceral

A LV é uma doença crônica e sistêmica que afeta órgãos internos como fígado, baço e medula óssea e que, se não for tratada, pode evoluir para o óbito em 100% dos casos (OMS, 2014; Pelissari, 2011).

Na fase aguda da doença, os sintomas são febre intermitente, fraqueza, tosse seca, perda de peso, diarreia e hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e do baço). Já na fase crônica da doença, os sintomas são emagrecimento (nos casos mais raros esse emagrecimento pode levar à caquexia), formação de edemas devido à diminuição da albumina plasmática produzida pelo fígado, e casos de hemorragias ocasionadas pela plaquetopenia (Stebut, 2015; Hailu, 2016). As lesões hepáticas caracterizam-se através de inflamações granulomatosas e hiperplasia de células de Kupfer que podem significar lesões de origem imunopatológica (Brito et al, 2004). Na LV também podem ocorrer casos de hemorragia, devido ao sequestro de plaquetas pelo baço, dificultando a atividade plaquetária (Luvizotto, 2006). Porém, há relatos de pessoas que contraem a infecção e não desenvolvem a sintomatologia da doença, sendo consideradas assintomáticas. Já no caso de pacientes imunossuprimidos (HIV positivo), a manifestação clínica da LV é incomum, podendo levar o paciente à óbito antes mesmo de apresentar os sintomas clínicos (Neves, 2010; Cota et al, 2012, Lindoso et al, 2016).

No fígado, as alterações histopatológicas podem ocorrer através da hipertrofia e hiperplasia das células de Kupfer (altamente parasitados). Também ocorre uma expansão do espaço porta através do infiltrado de macrófagos (Duarte, 1987). Já no baço as alterações histológicas se dão através da hiperplasia e hipertrofia do sistema fagocítico mononuclear. As células desse sistema se encontram altamente parasitadas na região da polpa vermelha (Laurenti, 2010).

Em cães, a LV pode ocasionar alterações neurológicas tais como letargia, convulsões, tremores, paralisia da mandíbula, rigidez raquial cervical, entre outros. Esses sintomas estão associados à inflamação meningial crônica com infiltrado linfoplasmocitário, ocasionado pelo rompimento da barreira hemotocerebral pelos parasitas (Viñuelas et al, 2001; Lima et al, 2003).

1.2.1. Relação Patógeno – Hospedeiro: Resposta Imune na Leishmaniose Visceral

Leishmania spp., apresenta diversos mecanismos de escape para sua sobrevivência em ambientes hostis como o no hospedeiro vertebrado. Um primeiro mecanismo que pode ser descrito se dá pela escolha do vetor (flebotomíneo). A saliva do flebotomíneo possui fatores anticoagulantes e vasodilatadores que inibem a resposta inflamatória, facilitando a entrada e sobrevivência do parasita no hospedeiro vertebrado, podendo levar à uma exarcebação da infecção através da inibição de mecanismos microbicidas (Vannier-Santos, 2002).

O sistema imune inato participa fortemente na proteção contra a infecção através da produção de citocinas como IL-12 (produzida por células dendríticas) que desencadeia a ativação de células natural killer (NK) que são fonte para a produção de interferon gama (IFN- γ) que controlam a infecção pelo parasita (Maurer, 2009; Saporito, 2013).

O fator de necrose tumoral (TNF) possui um papel importante para o controle dos parasitas em órgãos como fígado e baço através da produção de granulomas, porém esses granulomas podem causar lesões teciduais afetando o sistema imunológico (Stanley, 2007; Saporito, 2013).

Uma das teorias em relação à resposta imune durante a infecção é de acordo com a diferenciação de células precursoras Th0 em Th1 ou Th2. Caso a diferenciação se dê por Th1, ocorrerá ativação de macrófagos fazendo com que haja o controle da infecção. Mas se Th0 se diferenciar em Th2, terá ativação de células B (resposta humoral), produção de citocinas como IL-4, IL-6 e IL-10, resultando em susceptibilidade à infecção e exacerbação da doença, devido à inibição da ativação de macrófagos com consequente replicação intracelular do parasita (Costa-Silva et al, 2015). Ainda não se sabe ao certo o que leva essa diferenciação da resposta imune, porém alguns autores acreditam se isso ocorra pela diferença de virulência de cada cepa (Campos-Ponce, 2005).

1.2.2. Tratamento atual da Leishmaniose visceral

O tratamento da LV ainda é um desafio, uma vez que os medicamentos usados na clínica ainda são os mesmos descobertos no início do século passado (Pastorino, 2002). Esses fármacos apresentam limitações tais como alta toxicidade, necessidade de hospitalização, administração parenteral, risco de resistência e alto custo de tratamento (Tempone *et al*, 2011; Akbari, 2017; Romero, 2016). A quimioterapia da LV utiliza principalmente os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B como principais fármacos da LV (Rathet *al.*, 2003; Pham, 2013). A miltefosina é o único medicamento oral para o tratamento da LV, porém está aprovado somente na Índia e já apresenta casos de resistência (Hendrickx, 2015).

a) Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (Sb^V) foram desenvolvidos em 1920, na Índia, e são utilizados na clínica da leishmaniose cutânea e visceral há quase 100 anos, e ainda hoje são os fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil. O Sb^V apresenta alta toxicidade para os humanos. A OMS recomenda que a dose utilizada seja de 20 mg/kg/dia, com um período de administração extenso, de até 30 dias (Herwaldt, 1992; Uliana, 2017).

Os efeitos adversos do Sb^V podem se manifestar como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, pancreatite, insuficiência renal, anemia, náuseas, entre outros. A via de administração é intravenosa ou intramuscular em um processo lento na tentativa de diminuir os efeitos colaterais, o que faz com que o paciente tenha que realizar a administração em um hospital (Akbari, 2017). Devido às falhas terapêuticas e elevado casos de resistência do parasita, esses fármacos não são mais usados em algumas regiões, como no estado de

Bihar na Índia (Sundar, 2001; Tempone et al., 2011; Sazgarnia et al., 2013; Vacchina, 2016).

b) Anfotericina B

A anfotericina B desoxicolato é um antifúngico que tem apresenta eficácia contra a leishmaniose visceral. Este fármaco é utilizado em casos onde há resistência e pouca eficácia dos antimoniais pentavalentes, ou quando existem comorbidades cardíacas prévias relatadas pelo paciente (Alvar, 2006; Akbari, 2017).

A anfotericina B deve ser administrada pela via intravenosa, em doses de 1 mg/kg em 15 dias alternados, e devido à sua alta toxicidade, a infusão deve ser lenta (entre 4 – 6 horas), necessitando internação do paciente (MS, 2006; Romero, 2016; Uliana, 2017).

Os efeitos colaterais da administração são: anemia, hipocalemia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, entre outros. Durante a infusão pode ocorrer náusea, febre, dores musculares e vômitos (Lindoso et al, 2012; Akbari, 2017).

c) Anfotericina B: Formulações Lipídicas e Lipossomal

Em uma tentativa de diminuir os efeitos colaterais da anfotericina B, foram desenvolvidas formulações lipídicas, altamente utilizadas nos casos da LV, em que foi possível diminuir a toxicidade e melhorar a biodisponibilidade. A forma lipídica é absorvida diretamente pelos macrófagos, tornando o fármaco específico para as células – alvo. A desvantagem dessa formulação é o alto custo, dificultando a utilização em países subdesenvolvidos (Akbari, 2017; Uliana, 2017). A administração da forma lipídica deve ser realizada por via intravenosa, por infusão lenta (4 – 6 horas) com dose de 3 mg/kg/dia por sete

dias (MS, 2006; Romero, 2017). Os efeitos adversos são leves quando comparados com a formulação livre, tais como erupções cutâneas, urticárias e insuficiência renal (Akbaru, 2017).

d) Pentamidina

A pentamidina começou a ser utilizada no tratamento contra LV em 1940 na Índia, porém, os altos de efeitos tóxicos como cardiotoxicidade e distúrbios metabólicos, e relatos de resistência ao fármaco, fizeram com que esse fármaco fosse deixado de lado (Bray, 2003). Devido aos casos de resistência contra antimoniais pentavalentes, a pentamidina voltou a ser utilizada para o tratamento da leishmaniose cutânea (Uliana, 2017).

A administração se dá por via intravenosa, com dose de 4 mg/kg/dia, em dias alternados, no total de 15 doses (Croft, 2003; WHO, 2010; Nagle et al, 2014).

e) Paromomicina

Paromomicina é um antibiótico que demonstrou atividade contra espécies de *Leishmania in vitro* e *in vivo*. A paromomicina apresentou bons resultados para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea em modelo animal (Kim et al. 2009). Estudos clínicos têm sido realizados na Índia para LV, onde o tratamento antimonial padrão não é efetivo e as taxas de mortalidade são altas. A administração deve ser por via intramuscular, com doses de 15 mg/kg/dia por 21 dias. O efeito colateral inclui nefrotoxicidade (Pandey et al, 2009; Wiwanitkit, 2012).

f) Miltefosina

Miltefosina (MIL) é um fármaco que foi desenvolvido como anti-inflamatório e posteriormente usado para o tratamento de neoplasias; hoje é usado no tratamento de infecções microbianas, fúngicas e LV (Croft et al, 1987; Sundar, 2007; Uliana, 2017). Em 2002, houve a introdução da MIL para o tratamento da LV, como primeiro fármaco administrado pela via oral, fazendo com que o paciente não necessitasse de internação para realizar o tratamento, diminuindo custos hospitalares (Vacchina, 2016; Akbari, 2017; Uliana, 2017). Na Colômbia, a MIL já está aprovada para o tratamento da leishmaniose cutânea (LC). No Brasil, existem estudos que demonstram a eficácia da MIL de 70% no tratamento de pacientes com LC (Machado et al, 2010; Chrusciak-Talhari, et al, 2011).

Por apresentar efeito teratogênico, a MIL não pode ser administrada em mulheres grávidas e que estejam amamentando. Outro problema, é que MIL apresenta um tempo de meia vida plasmática prolongada, podendo levar o surgimento de resistência (Dorlo et al, 2008; Akbari, 2017). A dose recomendada é de 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias. Em 2009, Pandey relatou um estudo de fase clínica III e IV em que houve uma taxa de cura de 94% no tratamento da leishmaniose visceral.

Os efeitos adversos da monoterapia com MIL são: vômito, diarreia, toxicidade gastrointestinal, hepática e renal, mas são considerados gerenciáveis (Akbari, 2017; Uliana, 2017). Estudos recentes relataram falhas na terapia contra LV, e já são observados casos de resistência ao fármaco, nesse caso é recomendado que seja realizada uma única dose de anfotericina B lipossomal (Sundar e Chatterjee, 2016; Akbari, 2017; Hendrickx, 2017).

1.3. Reposicionamento de fármacos

A introdução de um novo medicamento, desde seu conceito inicial até a chegada ao mercado é um processo lento e caro, e seu desenvolvimento leva em torno de 10 a 17 anos com um custo estimado de 1 a 8 bilhões de dólares, além de apresentar baixa probabilidade de sucesso, inferior à 10% (Paul *et al*, 2010). Por isso, se fazem necessárias estratégias alternativas como o processo de reposicionamento de fármacos.

O reposicionamento de fármacos é a aplicação de medicamentos com segurança clínica conhecida e comprovada para outras doenças e/ou indicações, sendo uma excelente abordagem para redução do custo e tempo, uma vez que já estão aprovados e se encontram no mercado (Andrews, 2014; Huang, 2015).

Ao se usar essa estratégia, várias fases de desenvolvimento necessárias para novos fármacos, podem ser encurtadas e até mesmo ignoradas (Figura 7), uma vez que os candidatos já passaram por diversos testes, e já se tem informações de farmacocinética e toxicidade (Ashburn, 2004; Charlton, 2017).

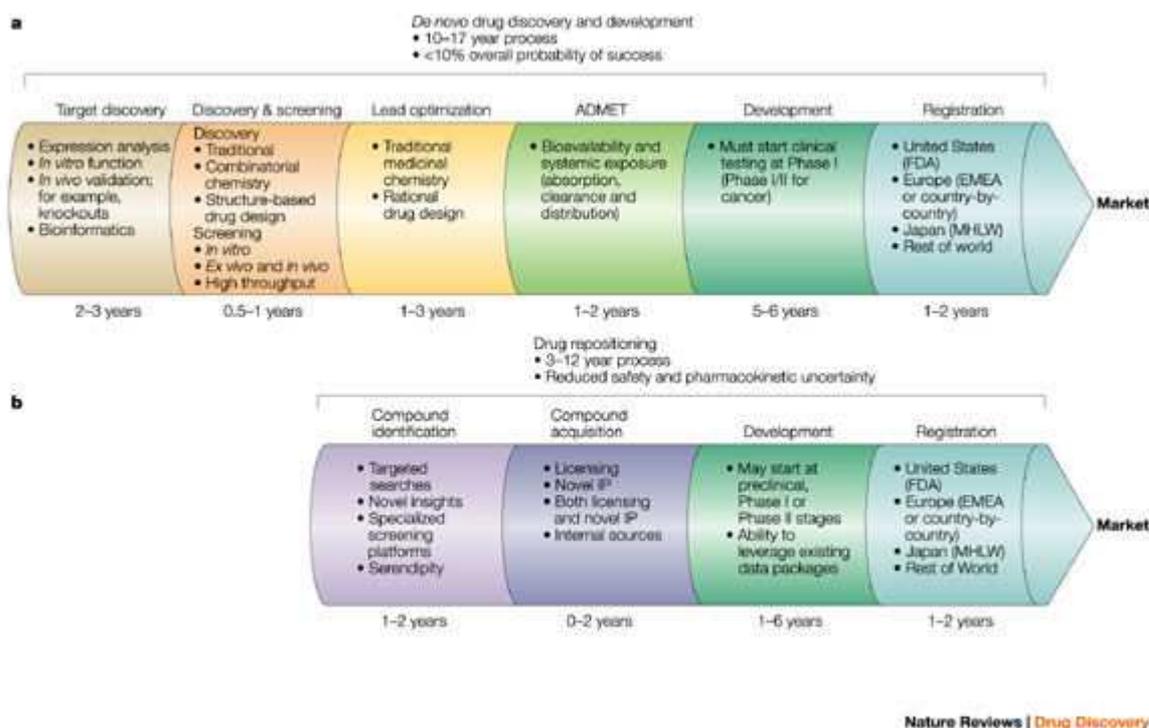


Figura 8: Etapas do desenvolvimento de novos fármacos e reposicionamento de fármacos. Fonte: Ashburn, 2004.

Atualmente todos os fármacos utilizados na clínica contra a leishmaniose visceral foram reposicionados. Exemplos incluem a anfotericina B, um fármaco que inicialmente foi utilizado para o tratamento antifúngico (Tempone et al. 2011); a pentamidina, inicialmente sintetizada contra *Trypanosoma brucei* e posteriormente usada no tratamento de pneumonia (Sundar et al. 2006); a paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo (Lima et al., 2007; Santos et al. 2008) e a miltefosina, sintetizada como antiinflamatório (Lima et al, 2007). Desta forma, a busca de um novo uso para fármacos aprovados pode representar um importante avanço na área de Saúde Pública, reduzindo custos, tempo e aumentando a adesão dos pacientes para o tratamento (Mesquita, 2014).

1.4. Sertralina

Sertralina (SERT) (Figura 8) é um antidepressivo da família dos inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS), que atualmente apresenta diversos usos terapêuticos que incluem desde auxílio contra a depressão, contra o transtorno obsessivo compulsivo, fobia social e até no tratamento de dor em estado crônico (Santuzzi et al, 2012; Onalopo et al, 2017). A SERT é administrada pela via oral nas doses de 50 a 100 mg/dia para o tratamento de depressão (Saiz-Rodriguez et al, 2017).

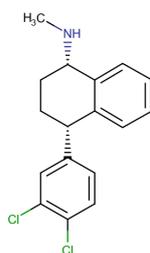


Figura 9: Estrutura química da sertralina. Fonte: DrugBank (2017).

A SERT é metabolizada pelo fígado e se transforma em desmetilsertralina; existem pelo menos cinco isoformas do citocromo P450 (CYP) envolvidos desmetilação da sertralina: *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* (Kobayashi et al, 1999; Wang et al, 2001; Obach et al, 2005; Spina et al, 2015; Saiz-Rodriguez et al, 2017).

Os ISRS atuam aumentando os níveis extracelulares de serotonina e bloqueando o transportador de serotonina do cérebro que é mediado pela recaptação do mesmo (Onalopo et al, 2017). Segundo Santuzzi (2012), o efeito antidepressivo da sertralina ocorre após três semanas de tratamento, enquanto que a ação analgésica ocorre logo após a administração de uma única dose. O efeito analgésico está relacionado a ativação do sistema opióide endógeno. Durante o uso agudo, os ISRS bloqueiam a recaptação da serotonina e aumentam a estimulação da mesma. Já durante o uso crônico, ocorre a dessensibilização do receptor da serotonina (5-HT_{1A}).

SERT também pode modular as funções dos neurotransmissores e seus receptores de forma indireta, fazendo com que a resposta seja diferente em humanos e em roedores. Em roedores, SERT parece induzir a sensibilidade à dor, melhorar a função motora e aumentar a resposta de defesa ao medo (Peng et al, 2008; Santuzzi, 2012; Cassaday e Thur, 2015).

O efeito clínico da SERT se dá pela melhora do humor e da diminuição da ansiedade que ocorre através de alterações na função neuronal que conduzem a uma neurotransmissão serotoninérgica melhorada. Os efeitos secundários incluem boca seca, náuseas, tonturas, sonolência, disfunção sexual e dor de cabeça (DrugBank, 2017; Alvar et al, 2004)

Em 2008, Palit e Ali fizeram um estudo em que demonstraram atividade anti-*Leishmania donovani* da SERT livre com administração oral. Nos testes *in vitro*, a SERT eliminou 97% dos promastigotas na maior concentração testada (30 µg/mL), enquanto que na menor concentração testada (3 µg/mL) foi observada diminuição da mobilidade dos promastigotas. Já em experimentos *in vivo*, a SERT foi administrada por via oral em 10 mg/kg, e após o tratamento apresentou uma redução da carga parasitária em 72% no baço e 70% no fígado quando comparado com o grupo controle. Estes dados sugerem a SERT como um possível fármaco candidato para a terapia anti-*Leishmania*.

1.5. Farmacocinética

A farmacocinética (PK) estuda um fármaco ao entrar em contato com o organismo, desde o processo de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME). Já a farmacodinâmica, estuda a interação deste fármaco com o tecido (Smith et al, 2012). Normalmente, os parâmetros da farmacocinética são medidos através do sangue ou do plasma são eles:

- Tempo de meia vida plasmática ($T_{1/2}$): tempo que o fármaco leva para que sua concentração diminua pela metade da concentração inicial.

- Concentração máxima (C_{max}): concentração máxima que um fármaco atingiu durante o período estudado.
- Tempo máximo (T_{max}): tempo máximo para se atingir o C_{max} .
- Área Abaixo da Curva (AUC): quantidade de fármaco disponível no organismo.

Atualmente foi feita a proposta para que estes estudos sejam realizados no início das pesquisas, uma vez que estudos de PK podem ajudar a minimizar o uso de animais, encurtar o tempo de desenvolvimento de um fármaco, estimar o regime de administração de um determinado fármaco podendo descartar compostos que não são promissores nas etapas iniciais da pesquisa (Muller et al, 2012; Tuntland et al, 2014).

A SERT é metabolizada no fígado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP), um substrato da glicoproteína P; apresenta um T_{max} de cerca de 4-8 horas e C_{max} de 31 ng/mL após uma única administração, tendo sua meia vida plasmática ($T_{1/2}$) de aproximadamente 24 horas (Alderman et al, 1998; Saiz-Rodriguez et al, 2017).

1.6. Lipossomos

Uma alternativa para o tratamento da LV é a elaboração de sistemas de liberação de fármacos, como os lipossomos. Esse sistema de entrega direcionada de fármacos apresenta potencial para o tratamento de diversas doenças. Atualmente, os lipossomos vêm sendo explorados para o tratamento de câncer (Eloy, 2017).

O primeiro uso de lipossomo foi creditado por Cevc e Blume, em 1922, ao conseguir facilitar a passagem de um fármaco pelo estrato córneo da pele (*apud* Hussain et al., 2017). Em 1978, Alving e colaboradores obtiveram sucesso no uso de lipossomos contra leishmaniose, demonstrando uma eficácia 700 vezes maior dos antimoniais na forma lipossomal quando

comparados aos antimoniais na forma livre. A primeira formulação de um fármaco aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) foi a Doxil® em 1995, usada no tratamento de câncer. À partir disso, uma variedade de fármacos na forma lipossomal foi desenvolvida e já se encontram disponível no mercado, como DaunoXome®, DepoCyt®, Myocet®, Lipodox® e Marqibo®, todos utilizados na terapia contra neoplasias (Eloy et al, 2017; Teixeira et al, 2017).

Os lipossomos são vesículas lipídicas formadas por fosfolipídeos e esteróis, com um interior aquoso e uma membrana lipofílica, podendo apresentar diversos tamanhos e são utilizados para encapsular tanto fármacos hidrofílicos quanto fármacos lipofílicos (Figura 9). Os lipídios mais utilizados são a fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline, formando vesículas estáveis em solução aquosa (Batista, 2007; Eloy, 2017). Os lipossomos podem ser classificados em três principais categorias de acordo com o número de lamelas: vesícula multilamelar (LVM -100 a 1000 nm); vesícula unilamelar pequena (SUV - 25 nm) e vesícula unilamelar grande (LUV -1000 nm) (Torchilin and Weissing, 2003).

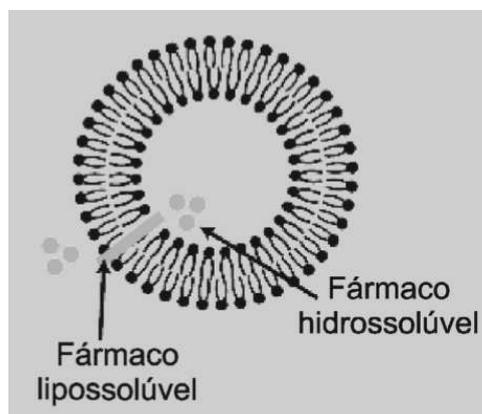


Figura 10: Esquema ilustrativo de um lipossomo podendo conter fármacos hidrofílicos (cavidade interna) ou fármacos lipofílicos (retido na bicamada lipídica). Fonte: Pimentel, 2007.

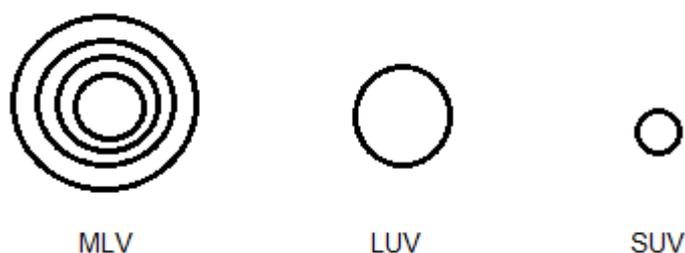


Figura 11: Esquema de classificação dos lipossomos. MLV -Vesícula multilamelar (100 a 1000 nm); LUV - vesícula unilamelar grande (1000 nm), SUV - vesícula unilamelar pequena (25nm)

O tamanho do lipossomo está relacionado com a velocidade de remoção dessas vesículas da circulação. Lipossomos maiores (400 nm) são removidos mais rapidamente do sangue do que quando comparados com lipossomos menores (200 nm) (Laverman et al, 1999).

Os lipossomos convencionais são compostos por fosfolípidos e colesterol e podem ter carga positiva ou negativa para evitar a agregação de vesículas, aumentando sua estabilidade. Em sistema *in vivo*, esses lipossomos são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear sendo removidos rapidamente da circulação (Vemuri, 1995). A adição de colesterol na formulação dos lipossomos está relacionada com o aumento da estabilidade, uma vez que o colesterol exerce uma função de rigidez na membrana do mesmo, melhorando sua integridade e tempo de circulação (Moghimi, 1998; Sengupta et al, 2000).

No caso da LV, os macrófagos são as células alvos para a terapia, e possuem um importante papel devido à sua natureza fagocítica, e expressam diversas proteínas de superfície, que são conhecidas como receptores celulares. Os receptores do tipo *Scavenger* (SR) desempenham um papel importante na imunidade e na homeostase inata. Os SR são altamente específicos, o que os tornam grandes candidatos para a mediação da ligação com os lipossomos facilitando a entrada em macrófagos, uma vez que estes receptores possuem a função de reconhecer lipoproteínas, células em

apoptose, colesterol, fosfolipídios e carboidratos (Tempone, et al, 2004; Zani et al, 2015).

Em 2017, Costa-Silva e colaboradores realizaram um experimento com o objetivo de identificar qual seria a rota mais apropriada para a administração da formulação lipossomal do fármaco buparvaquona no modelo experimental de LV. Foram testadas três vias de administração diferentes: subcutânea, intravenosa e intramuscular. A via subcutânea mostrou ser a via mais efetiva reduzindo a carga parasitária em 98% no baço e 96% no fígado na menor dose testada (0,4 mg/kg) em hamsters previamente infectados com *Leishmania* (L.) *infantum*, quando comparados com o grupo controle.

1.7. Associação de fármacos

A terapia em associação propõe um tratamento de menor duração, toxicidade, custo e menor risco de desenvolvimento de resistência, tendo uma maior adesão ao tratamento (DNDi, 2012). Estudos na Índia demonstraram que tratamentos com anfotericina B seguidos de miltefosina ou paromomicina, e administração concomitante de miltefosina e paromomicina apresentaram taxas de cura de 95% (Olliaro, 2010).

A associação de dois fármacos pode produzir valores de CE_{50} mais altos, mais baixos ou iguais aos valores dos fármacos previstos separadamente. Esse método baseia-se no conceito de equivalência, isto é, uma dose igualmente eficaz de um fármaco irá adicionar seu efeito à dose do outro fármaco. Para fármacos com potência equivalente, são geradas isobogramas aditivos lineares, ou seja, curva de efeito constante. Essa relação pode gerar curvas não lineares que podem ser sinérgicas ou antagônicas (Figura 11). Para construir um isoblograma, deve-se gerar uma curva aditiva para avaliar as interações sinérgicas e antagônicas da associação (Tallarida, 2006).

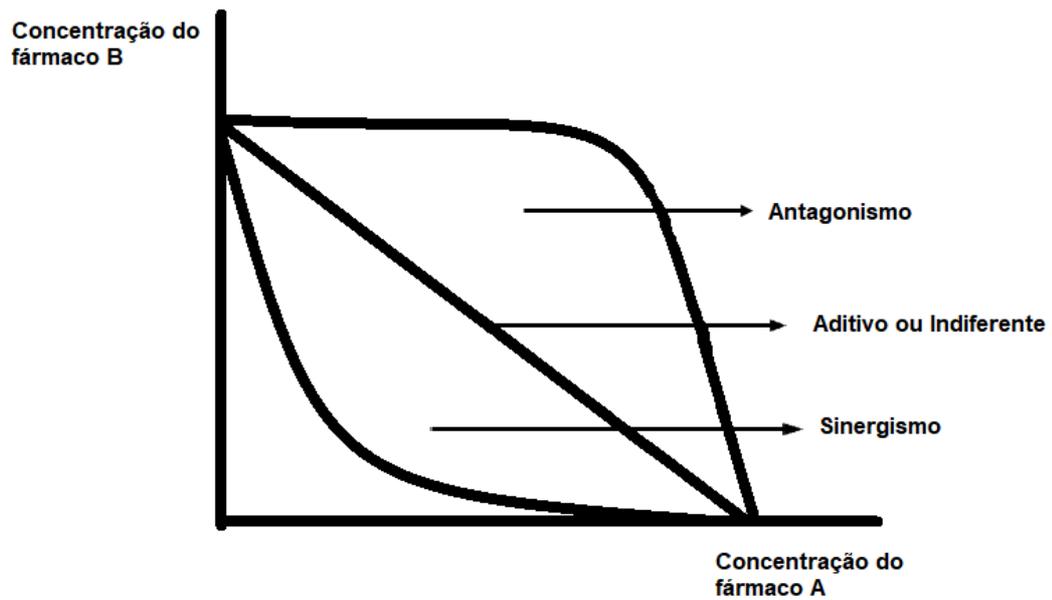


Figura 12: Isobolograma representativo de possíveis associações antagônicas, aditivas e sinérgicas. Fonte: Tallarida, 2006.

Justificativa

Devido ao reduzido arsenal terapêutico da LV, assim como elevada toxicidade dos fármacos em uso clínico, existe uma necessidade urgente da busca por novos tratamentos. O reposicionamento de fármacos já demonstrou ser uma abordagem muito promissora na introdução de terapias alternativas, com significativa redução de tempo e custo das pesquisas. Estudos prévios já mostraram atividade da sertralina contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) donovani*. Sendo assim a sertralina se mostra um fármaco promissor para o tratamento da LV.

2. Objetivos

Geral

Estudar o potencial anti-*Leishmania (L.) infantum in vitro* e *in vivo* da sertralina (SERT) livre e encapsulada em nanolipossomos.

Específicos

1. Avaliar a atividade anti-*Leishmania (L.) infantum in vitro* da SERT contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares e sua citotoxicidade em células de mamífero.
2. Avaliar a associação terapêutica *in vitro* da SERT e MIL em promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*.
3. Estudar o perfil farmacocinético da SERT em modelo animal.
4. Avaliar o potencial anti-*Leishmania (L.) infantum* da SERT livre em modelo murino.
5. Desenvolver uma formulação nanolipossomal de sertralina (SERT-LP) e caracterizá-la por métodos físico-químicos.

6. Avaliar a eficácia da SERT-LP em modelo murino, analisando o perfil histopatológico dos órgãos infectados após tratamento e determinar a resposta celular imune dos camundongos.
7. Estudar a biodistribuição da SERT-LP em modelo murino infectado com *Leishmania infantum*.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes

DMSO, glicerol, dodecil sulfato de sódio, metanol, foram obtidos da Merck. Colesterol, MTT- (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio), meio RPMI-PR 1640, meio Schneider's Insect, adquiridos da Sigma. O fármaco sertralina foi gentilmente doado pelo Professor Humberto Ferraz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Outros materiais quando não mencionados foram adquiridos da Sigma.

3.2. *Leishmania (L.) infantum*

Cepa MHOM/MA67ITMAP263: As formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/MA67ITMAP263) foram obtidas através do isolamento de fígado de camundongos BALB/c previamente infectados e mantidos como promastigotas à 25°C em meio Schneider's, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,25% de hemina em estufa BOD. Para a manutenção da cepa, camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^8 promastigotas pela via intraperitoneal, após 15 dias de infecção, os animais tinham o fígado removido e foi realizado o isolamento de amastigotas para que se transformassem em promastigotas.

Cepa MHOM/BR/1972/LD: As formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 0,25% de hemina, sob a temperatura de 24° C em estufa BOD, livre da adição de antibióticos. As formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* foram obtidas procedendo-se a centrifugação diferencial de baço de hamsteres previamente infectados e o número de parasitas foi determinado pelo método descrito por Stauber e colaboradores

(1958), 60 a 70 dias pós-infecção. A cepa MHOM/BR/1972/LD foi utilizada para realizar o experimento: 3.10. Captacção *in vitro* da SERT-LP por macrófagos.

3.3. Células de mamíferos

Células de tecido conjuntivo de camundongo, NCTC clone 929, do American Type Culture Collection (ATCC CCL1), fornecidas pela Seção de Cultura Celular do Instituto Adolfo Lutz – SP foram mantidas em meio RPMI-PR 1640 suplementado com 10% de SFB em estufa com 5% de CO₂, sob temperatura de 37°C.

Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c (fêmeas) através de lavagens com meio RPMI-PR 1640, suplementado com 10% de SFB e mantidos em estufa com temperatura de 37°C com 5% de CO₂.

3.4. Animais de experimentação

Os animais utilizados para esse estudo foram fornecidos pelo biotério do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Camundongos fêmeas BALB/c foram infectados via intraperitoneal (i.p.) com 1×10^8 promastigotas por animal para manutenção da cepa, e para estudos *in vivo*.

Camundongos BALB/c fêmeas foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais. Todos os procedimentos realizados com animais tiveram aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur (04/2016).

3.5. Lipossomos

3.5.1. Preparo da sertralina lipossomal

O preparo dos lipossomos se deu de acordo com o protocolo estabelecido por Costa-Silva (2017).

Os lipossomos foram produzidos pelo método de hidratação de lipídeos, seguido por sonicação e extrusão em membranas de 0,8nm; 0,4nm; 0,2 nm (Szoka e Papahadjopoulos, 1978). Para a preparação dos lipossomos fosfatidilserina, fosfatidilcolina e colesterol foram utilizados na proporção molar 7:2:1 (Tempone et al, 2010). Para isso, o fármaco estudado, sertralina, foi diluído em metanol (solução A) e os lipídeos em clorofórmio (solução B). Posteriormente as duas soluções A e B foram unidas e sonicadas por aproximadamente 10 minutos e evaporadas em rotaevaporador rotativo à 55° C à 40 rpm. Após a evaporação foi adicionada solução de glicerol 2,25% (tamponada com tampão fosfato 10 mM) previamente aquecida com pérolas de vidro por 60 minutos, seguido por sonicação por 30 minutos. Após este processo os lipossomos foram extrusados (Aventis) com membranas de policarbonato de 0,8 nm; 0,4 nm; 0,2 nm (Costa-Silva et al, 2017).

3.5.2. Quantificação de sertralina nos lipossomos

A concentração de SERT encapsulado foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com um sistema binário (Prominence LC-20; Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) e uma matriz de detectores de fotodiodos ultravioleta (PDA) SPDM20A em uma coluna ACE C4 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm, tamanho de partícula 5 µm). O comprimento de onda foi ajustado a 251 nm. A taxa de fluxo foi de 1 mL/minuto utilizando um método isocrático com metanol (7:3 v/v) e água com ácido trifluoro acético a 0,1% (TFA). SERT foi diluída em isopropanol (1 mg/mL) para obter uma solução para a curva padrão (3.125–400 µg/mL), e 20 µL das

amostras foram injetadas na coluna. SERT-LP foi diluída em isopropanol para separação dos lipídeos da sertralina. Os resultados obtidos partir da curva padrão foram extrapolados e utilizados para confecção de uma curva de regressão linear.

3.5.3 Avaliação do diâmetro e carga dos lipossomos

Para avaliar o diâmetro médio e a carga dos lipossomos, estes foram preparados usando o protocolo descrito por Costa-Silva e colaboradores (2017) com adição ou não do fármaco. O diâmetro e a carga foram determinados por meio da técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) em um aparelho Malvern Zeta Sizer Nano ZS, com laser HeNe (633 nm). Este estudo foi realizado no Instituto de Física da USP, com a colaboração do Prof. Dr. Leandro Barbosa

3.6. Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos fármacos estudados

3.6.1. Promastigotas

SERT foi dissolvido em DMSO e o fármaco padrão MIL foi dissolvido em água mili-Q estéril. Em seguida, ambos os fármacos foram diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas, na forma promastigota, em diferentes concentrações (concentração inicial de 150 µM), através de diluição seriada (base 2) para se determinar as respectivas CE₅₀. Foram utilizado promastigotas de *L. (L.) infantum* em fase estacionária, com 1x10⁶ de parasitas por poço em placas de 96 poços contendo os fármacos diluídos em meio Schneider, suplementado com 10% de SFB. Após um período de 48 horas, a viabilidade dos promastigotas foi determinada por meio do ensaio colorimétrico com MTT,

a leitura foi feita em espectrofluorímetro de placas (FilterMax) com filtro de absorvância de 570 nm. O controle positivo (100% células vivas) se deu através de células promastigotas não tratadas. Os ensaios foram realizados em duplicatas e feitos pelo menos dois ensaios distintos.

3.6.2. Amastigotas

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas por meio de lavagem em meio RPMI-PR 1640, suplementado com 10% de SFB. Foram plaqueados 1×10^5 macrófagos por poço em placas de 16 poços (NUNC[®]) e posteriormente incubados por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, os macrófagos foram infectados com as formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* obtidos de cultura celular, isoladas através do fígado de camundongos BALB/c previamente infectados na proporção de 10:1 promastigotas/macrófago (1×10^6 promastigotas/poço), e incubados por 4 horas para internalização em macrófagos e transformação em amastigotas. Os macrófagos infectados foram tratados com os fármacos SERT e MIL (concentrações iniciais determinadas a partir de ensaios de citotoxicidade) que foram seriadamente diluídos e incubados por 72 horas sob as mesmas condições (Tempone et al., 2005). Ao final do ensaio, as lâminas foram fixadas em metanol, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico. A CE₅₀ foi determinada por meio da contagem de 400 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados (Yardley e Croft, 2000). Como controle do ensaio foi utilizado macrófagos infectados não tratados. Os ensaios foram realizados em duplicatas e feitos pelo menos dois ensaios distintos.

3.7. Determinação *in vitro* da concentração citotóxica 50% (CC₅₀) frente a células de mamíferos e determinação do índice de seletividade (IS)

Para o ensaio de citotoxicidade, foram utilizadas células NCTC (clone 929), 6×10^4 células/poço, incubadas com os fármacos SERT e MIL, seriadamente diluídos em meio RPMI-PR 1640 com 10% SFB em placas de 96 poços. A placa foi incubada por 72 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ e para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT. Como controle (100% de células vivas), foram utilizadas células NCTC não tratadas. Os ensaios foram realizados em duplicatas e feitos pelo menos dois ensaios distintos.

O Índice de Seletividade (IS) dos fármacos em estudo, foi determinado através da seguinte razão:

$$IS = CC_{50} \text{ células de mamífero} / CE_{50} \text{ amastigota}$$

Em que fármacos com IS maior que 1 foram considerados seletivos.

3.8. Determinação *in vitro* da associação entre SERT e MIL

SERT foi associada com MIL, e a natureza das associações foi avaliada em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* utilizando-se a análise de isoblograma de proporções fixas modificado (Fivelman et al., 2004, Reimão e Tempone, 2011). Para a associação de fármacos foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.7.1. utilizando dois fármacos em proporções pré-determinadas. Para cada associação, os valores de CE₅₀ de cada fármaco isolado foi previamente determinado, assegurando assim o ponto de partida da diluição seriada de base dois. Os fármacos estudados foram dissolvidos em seus respectivos solventes e diluídos em meio RPMI-PR 1640 com 10% de SFB. As concentrações dos fármacos foram preparadas nas proporções: 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, em placas de 16 poços, em duplicata.

As concentrações iniciais da associação foram estabelecidas através das concentrações efetivas 50% tanto em promastigotas quanto em amastigotas.

A partir da CE_{50} de cada associação, foram realizados os seguintes cálculos:

1º - Concentração Inibitória Fracionária (CIF) = CE_{50} do fármaco combinado/ CE_{50} do fármaco individual.

2º- Somatória da Concentração Inibitória Fracionária (Σ CIF) = CIF do fármaco A + CIF do fármaco B.

3º-Média da Somatória da Concentração Inibitória Fracionária ($X\Sigma$ CIF) = Σ CIF/4

A $X\Sigma$ CIF foi utilizada para classificar as associações dos fármacos avaliados. Quando a $X\Sigma$ CIF foi menor ou igual a 0,5 a associação foi considerada sinérgica, quando foi maior que 0,5 e menor ou igual a 4, a associação foi considerada indiferente e quando foi maior que 4, a associação foi considerada antagônica (Odds, 2003).

3.9. Captação *in vitro* da SERT-LP por macrófagos

Os macrófagos peritoniais foram obtidos através do peritônio de camundongos BALB/c e plaqueados a 5×10^6 por 24 horas em placas de 24 poços. Em seguida foram infectados com amastigotas (1:10) obtidas de baço de hamster previamente infectado com *Leishmania* (L.) *infantum* cepa MHOM/BR/1972/LD. Procedeu-se após 24hs de infecção o tratamento de células infectadas e não infectadas com lipossomo marcado com Rodamina 123 (SERT-LP-R123) (10 μ /mL). As células foram raspadas dos respectivos poços e a intensidade da fluorescência expressa por unidades arbitrárias de fluorescência dentro dos macrófagos foi dosada por citometria de fluxo (Attune-Life technologies) avaliando-se até o tempo final de 270 minutos de tratamento no comprimento de onda de 610 nm. Foram avaliados 10.000 eventos por

amostra/tempo, para observação da internalização dos lipossomos marcados. Como controle foram utilizadas células não tratadas e os lipossomos isoladamente.

3.10. Ensaio *in vivo*

3.10.1. Avaliação da efetividade de SERT em diferentes vias em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum*

Para avaliar a efetividade da SERT *in vivo*, foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c (pesando entre 18-22 g) previamente infectadas pela via intraperitoneal (volume final 100 µL) com *L. (L.) infantum* cepa MHOM/MA67ITMAP263 (1×10^8 promastigotas em fase estacionária), utilizando cinco animais por grupo. Após cinco dias de infecção, os animais foram distribuídos em grupos de forma aleatória e o tratamento iniciado por diferentes vias: SERT livre pela via de administração oral, SERT livre subcutânea e SERT lipossomal (SERT-LP) subcutânea.

Para realizar o cálculo de conversão de dose de animal para humanos, foi utilizada a fórmula do índice HED (*Human equivalent dose*) que pode ser calculada pela seguinte forma (Reagan-Shaw et al, 2016):

$$\text{HED} = \text{dose utilizada no animal} * \text{fator } K_m \text{ do animal} / \text{fator } K_m \text{ do humano}$$

O fator K_m é calculado a partir da normalização da área de superfície corporal conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Tabela de conversão de doses de animais para doses equivalentes à humanos, baseados na área de superfície corporal (ASC):

Espécie	Peso (kg)	ASC (m²)	Fator k_m
Humano			
Adulto	60	1,6	37
Criança	20	0,8	25
Hamster	0,08	0,02	5
Camundongo	0,02	0,007	3

Peso em quilogramas (Kg). ASC: Área da superfície corporal em metros quadrados (m²). Fator k_m : constante de metabolismo de cada organismo. Fonte: Reagan-Shaw e colaboradores, 2016 (modificado).

3.10.2. Avaliação da farmacocinética em modelo animal:

Os parâmetros farmacocinéticos da SERT como AUC, C_{max} e T_{max} e $T_{1/2}$, foram mensurados em hamsters após administração oral por gavagem conforme estabelecido por Sokolova e colaboradores (2010). Para a SERT foram administrados 15 mg/kg oralmente (n=3 animais). Amostras de sangue (10 μ L) foram coletadas a partir da veia caudal em tubos Eppendorf contendo água MilliQ (20 μ L) em 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após a administração e armazenadas a -80°C. A extração de amostras de sangue foi realizada através de um método baseado em precipitação proteica utilizando acetonitrila. A curva de calibração foi construída a partir de valores de sangue contidos no composto teste. As análises foram determinadas por cromatografia líquida de Ultra Performance (UPLC) associada ao espectrômetro de massas pelo Dr. Kevin Read do Drug Discovery Unit da University of Dundee (Escócia).

3.10.3. Esquema de tratamento:

3.10.3.1. Avaliação da efetividade do tratamento com SERT livre pela via oral em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum*

Os animais foram infectados pela via intraperitoneal e distribuídos em cinco grupos contendo cinco animais/grupo, como descrito anteriormente. Os animais foram tratados com SERT livre nas doses de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg e 15 mg/kg pela via oral (VO) uma vez ao dia por 10 dias consecutivos. O fármaco foi solubilizado em água filtrada e a administração do fármaco foi realizada com o auxílio de uma agulha de gavagem em aço inox curva para camundongos. O grupo controle infectado não recebeu tratamento. Um grupo tratado apenas com o veículo (água filtrada), já havia sido testado anteriormente e não apresentou diferença do grupo não tratado. A avaliação da carga parasitária foi avaliada por diluição limitante (Buffet et al, 1995) após 10 dias do início do tratamento.

3.10.3.2. Avaliação da efetividade do tratamento com SERT livre pela via subcutânea em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum*

Os animais foram infectados pela via intraperitoneal e distribuídos em cinco grupos contendo cinco animais/grupo, como descrito anteriormente. Os animais foram tratados com SERT livre nas doses de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg e 15 mg/kg pela via subcutânea (SC) uma vez ao dia por 10 dias consecutivos. O fármaco foi solubilizado em solução salina 0,9% e a administração do fármaco foi realizada com o auxílio de uma agulha ultra fina com 6 mm de comprimento e calibre de 0,25 mm. A aplicação é realizada na região entre as escapulas dos camundongos com volume de 200 µl. O grupo controle infectado não recebeu tratamento. A determinação da carga

parasitária foi avaliada por diluição limitante após 10 dias do início do tratamento.

3.10.3.3. Avaliação da efetividade do tratamento com SERT-LP pela via subcutânea em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum*

Os animais foram infectados pela via intraperitoneal e distribuídos em cinco grupos contendo cinco animais/grupo, como descrito anteriormente. Os animais foram tratados com SERT - LP nas doses de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg e 15 mg/kg pela via subcutânea (SC) uma vez ao dia por 10 dias consecutivos. Um grupo foi tratado somente com o lipossomo branco (sem fármaco) para avaliar possível tratamento/toxicidade pelo lipossomo. SERT-LP foi solubilizado em solução de glicerol 2,25% e a administração do fármaco foi realizada com o auxílio de uma agulha ultra fina com 6 mm de comprimento e calibre de 0,25 mm. A aplicação é realizada na região entre as escapulas dos camundongos com volume de 200 µl. O grupo controle infectado não recebeu tratamento. A determinação da carga parasitária foi avaliada por diluição limitante após 10 dias do início do tratamento.

3.11. Determinação da carga parasitária por diluição limitante

A avaliação da carga parasitária por diluição limitante foi feita de acordo com Buffet e colaboradores (1995). Amostras de fígado foram pesadas, maceradas e diluídas em 5 mL de meio Schneider suplementado com 20% de SFB + hemina. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 0.8 rpm por 10 minutos em tubos falcon de 15 mL, retirados do sobrenadante 120 µL e iniciado a diluição seriada a partir de 1:1 até 4096 e incubados à 25°C. Após 7 dias foi feita a primeira leitura visual das microdiluições e a última leitura com 14 dias. Considerou-se como positivo o último poço que tivesse até 1 parasita viável

(vivo, com motilidade). Os cálculos de carga parasitária foram da seguinte forma :

(valor da diluição X 5000 µL)/ 120µL = quantidade de parasitas/mg do fígado.

3.12. Determinação da resposta imune

Analisou-se a produção de citocinas séricas e de sobrenadante do fígado dos grupos tratados (15 mg/Kg e 1 mg/Kg) e controle por citometria de fluxo utilizando o kit para *cytometric beads array* (CBA), conforme as instruções do fabricante. Foram escolhidos os grupos tratados de 15 mg/kg e 1 mg/kg devido ao resultado encontrado no tratamento *in vivo*. O Kit CBA foi utilizado para a quantificação das citocinas envolvidas na resposta inflamatória (IL-4, INF-γ, TNF-α, IL-6, IL-10 e IL-12p70) e para quantificação da quimiocina MCP-1 em uma mesma amostra. Seis populações de beads com distintas intensidades de fluorescência conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina foram misturadas para formar o CBA e após incubação com as amostras, as beads de captura das citocinas foram misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio e lidas no citômetro de fluxo FACSCanto II. As populações de beads foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência. A análise dos dados foi feita pelo software FACs DIVA, que converte a intensidade de fluorescência em concentração (pg/mL). As análises foram feitas pelo Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr. do Laboratório de Protozoologia (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/USP).

3.13. Estudo do perfil histopatológico

Ao final de cada tratamento, os animais foram eutanasiados, e posteriormente foi realizada a necrópsia com avaliação macroscópica e microscópica dos órgãos (fígado e baço). Os fragmentos de tecidos, devidamente identificados foram conservados em formalina tamponada 10% e

processados pelas técnicas histológicas, tais como fixação com formaldeído, processos de desidratação com álcool etílico, clarificação com xilol para que ocorra a remoção total do álcool; impregnação de parafina no tecido, usuais do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, para obtenção de cortes histológicos. As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina. O exame histológico foi analisado por microscopia óptica de luz, e teve o intuito de caracterizar e descrever as lesões histopatológicas (Guerra, 2016).

3.14. Biodistribuição da SERT-LP

Camundongos BALB/c (2/grupo/tempo) foram tratados pela via de administração subcutânea (em dose única) com SERT-LP marcada com o fluoróforo DIL C18 (um marcador lipofílico de membrana) (Tempone, 2010). Após os períodos de 0, 12, 24 e 48 horas pós-tratamento, os animais foram sacrificados. Destes, foram removidos fígado e baço para realização de imprint em lâminas de vidro. Em seguida, os imprints foram fixados com formaldeído 3,5% por 6 minutos, e realizadas lavagens (3 vezes) com tampão fosfato salina (PBS) para retirar possível excesso de formaldeído. Após as lavagens, foi realizada a permeabilização das amostras utilizando uma solução PGN (PBS, 0,2% de gelatina e 0,15% NaN₃) contendo 0,1% de saponina. Por fim, foi realizada marcação das células nucleadas com 10 µM de DAPI por 30 minutos e observação das amostras em microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse 80i - D-FL-EPI - Fluorescent Attachment) e realizadas as análises.

3.15. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio de curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares (r). As diferenças entre as amostras foram estatisticamente avaliadas pelo método não paramétrico. Foram considerados valores significativos valores com $p < 0,05$ (one-way ANOVA).

4. Resultados

4.1. Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE₅₀) da SERT

A sertralina e o fármaco padrão (miltefosina) foram incubados juntamente com as formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum* e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio colorimétrico de MTT. Após 48 horas de incubação, a SERT livre apresentou um valor de CE₅₀ de 0,7 µM. O fármaco MIL apresentou um valor de CE₅₀ de 16 µM (Tabela 2).

Para o ensaio com amastigotas intracelulares, os fármacos (SERT, SERT-LP e MIL) foram incubados por 72 horas juntamente com macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c previamente infectados com a forma promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum*, que após 4 horas se diferenciam para formas amastigotas intracelulares. A CE₅₀ variou entre 3 e 4 µM (Tabela 2).

A citotoxicidade foi avaliada utilizando células NCTC clone 929 incubadas com os fármacos (SERT, SERT-LP e MIL) por 72 horas, e a viabilidade celular foi avaliada através do método colorimétrico MTT. Todos os fármacos apresentaram citotoxicidade, porém o fármaco com o maior valor de CC₅₀ foi a MIL com 127 µM, enquanto que a SERT-LP se mostrou mais tóxica com CC₅₀ de 12 µM (Tabela 2).

Tabela 2: Valores das Concentrações efetivas 50% (CE₅₀) dos fármacos estudados contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*, citotoxicidade em células de mamífero (NCTC)

CE ₅₀ (µM) IC 95%				
Fármaco	Promastigota	Amastigota	Células NCTC	IS
sertralina	0,73 ±0,4	4,2 ±2,2	27,4 ±0,8	6,4
SERT-LP	-	2,5 ±1,6	12,05 ±2,4	4,8
miltefosina	16,2 ±0,02	3,1 ±1,6	127,7 ± 6,7	40,9

CE₅₀: Concentração efetiva 50%. IC 95%: Intervalo de confiança 95%. IS: Índice de seletividade, calculado pela razão entre CC₅₀ de células de mamíferos pelo CE₅₀ em amastigota. SERT: sertralina livre; SERT-LP: sertralina encapsulada em nanolipossomos.

4.2. Determinação *in vitro* da associação entre sertralina e miltefosina

4.2.1. Promastigotas

A associação entre a SERT e MIL foi avaliada *in vitro* pelo método de isoblograma com proporções fixas, utilizando as formas promastigotas. Foram geradas oito curvas de dose-resposta entre as associações e duas curvas dos fármacos testados isoladamente. A figura 12 representa as curvas de dose resposta dos fármacos (SERT e MIL) quando associados e quando isolados. É possível observar que houve aditividade da associação, uma vez não houve deslocamento das curvas para a esquerda (indicativo de sinergismo). O gráfico demonstra ainda que a SERT reduziu a viabilidade de 100% dos promastigotas nas maiores concentrações.

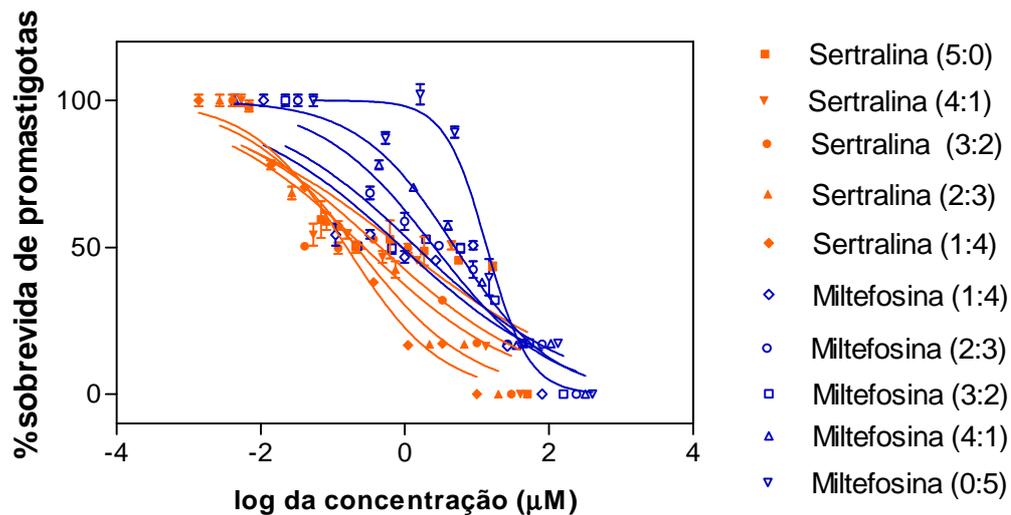


Figura 13: Curvas de dose resposta geradas pela associação de sertralina e miltefosina, na forma promastigota de *Leishmania (L.) infantum*. As concentrações estão representadas em μM . Figura representativa de um experimento.

A partir das curvas de dose resposta foi elaborada uma tabela (Tabela 3) com os valores de CE_{50} das associações e dos fármacos isolados. Neste estudo, a SERT isolada apresentou um valor de CE_{50} de $0,9 \mu\text{M}$, enquanto que a MIL, um valor de CE_{50} de $14 \mu\text{M}$. A tabela 3 demonstra que o valor de CE_{50} da SERT (representado pela letra A), diminui conforme a proporção de MIL aumenta (representado pela letra B). Os valores de CE_{50} dos fármacos quando associados geram valores de concentração inibitória fracionária (CIF), dado pela razão entre o CE_{50} da associação pelo CE_{50} do fármaco isolado. A somatória do CIF das associações variou entre 0,55 e 0,74, e a média da somatória do CIF, resultou em um valor de 0,64. Este valor sugere, de acordo com a referência adotada, uma associação aditiva.

Tabela 3: Valores de CE_{50} , CIF e \sum CIF gerados pela associação entre sertralina e miltefosina em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/MA67ITMAP263).

Fármaco associado		Proporção		CE_{50} da associação (μ M)		CIF da associação		\sum CIF	Média \sum CIF
				\pm Desvio Padrão					
A	B	A	B	A	B	A	B	A+B	
Sertralina	Miltefosina	5	0	0,96 (\pm 0,06)		-	-	-	
		4	1	0,45 (\pm 0,02)	1,81 (\pm 1,26)	0,47	0,12	0,59	
		3	2	0,40 (\pm 0,18)	2,15 (\pm 0,96)	0,42	0,15	0,57	
		2	3	0,34 (\pm 0,18)	2,81 (\pm 0,30)	0,35	0,19	0,54	
		1	4	0,23 (\pm 0,10)	7,35 (\pm 3,35)	0,24	0,50	0,74	
		0	5		14,62 (\pm 1,13)	-	-	-	
									0,61

CE_{50} : concentração efetiva 50%. CIF: Concentração inibitória fracionária. \sum CIF: somatória dos valores de CIF. Valores da concentração expressos em μ M. Valores representam a média de dois experimentos independentes.

A construção de isobogramas é uma outra forma de se analisar associações, em que os valores de CIF da associação são demonstrados em um gráfico. No isobograma, cada ponto é analisado em relação a faixa de aditividade, que varia de 0,5 a 4, onde valores abaixo de 0,5, indicam associações sinérgicas, e valores acima de 4 indicam antagonismo. Para a associação entre SERT e MIL, todos os pontos se encontraram na faixa entre 0,5 e 4, indicando que a associação foi aditiva (Figura 13).

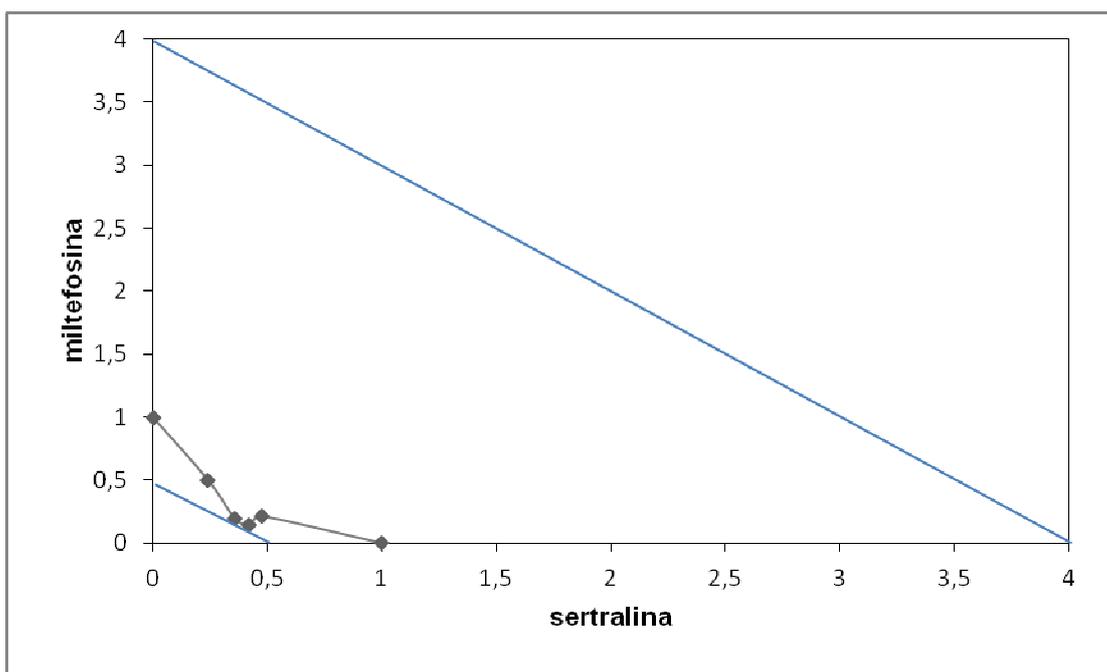


Figura 14: Isobograma gerado a partir da associação entre miltefosina e sertralina na forma promastigota de *Leishmania (L.) infantum*. Valores $\leq 0,5$ indicam associações sinérgicas. Valores entre 0,5 e 4 indicam associações aditivas, ou indiferentes. Valores ≥ 4 indicam associações antagônicas.

4.2.2. Amastigota

A associação entre a SERT e MIL foi realizada nas formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*, utilizando os métodos descritos anteriormente, com incubações de 72 horas. Na figura 14, é possível observar a curva de dose-resposta das associações, assim como dos fármacos isolados.

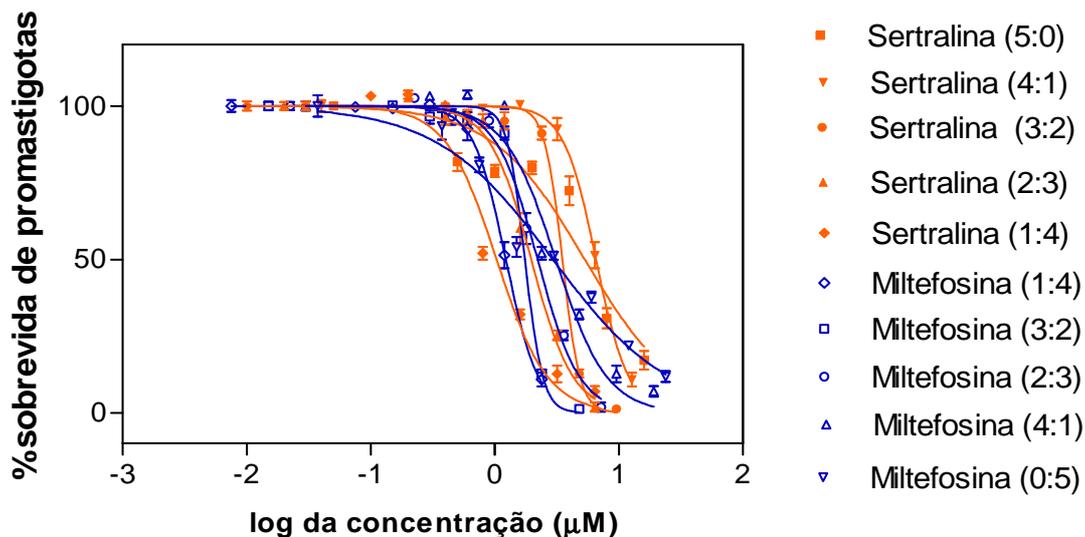


Figura 15: Curvas de dose resposta gerada pela associação de sertralina e miltefosina, na forma amastigota intracelular de *Leishmania (L.) infantum*. As concentrações estão representadas em μM . Figura representativa de um experimento.

Neste estudo, para a forma amastigota a SERT testada isoladamente apresentou um valor de CE_{50} de $5 \mu\text{M}$, enquanto que a MIL apresentou CE_{50} de $2 \mu\text{M}$ (Tabela 4). As somatórias das concentrações inibitórias fracionárias (ΣCIF) deste ensaio demonstraram valores entre 1,12 e 1,65, sendo que a média da somatória do CIF resultou em um valor de 1,31. De forma similar ao estudo com os promastigotas, o isoblograma apresentou pontos de CIF entre 0,5 e 4, indicando uma associação aditiva (Figura 15).

Tabela 4: Valores de CE_{50} , CIF e Σ CIF gerados pela associação entre sertralina e miltefosina em amastigota intracelular de *Leishmania (L.) infantum*

Fármaco associado		Proporção		CE ₅₀ da associação (µM)		CIF da associação		ΣCIF	XΣCIF
A	B	A	B	A	B	A	B	A+B	
Sertralina	Miltefosina	5	0	5,32 (±2,24)	-	-	-	-	
		4	1	6,57 (±0,66)	1,23 (±0,04)	1,23	0,41	1,65	
		3	2	3,51 (±0,34)	1,75 (±0,17)	0,66	0,59	1,25	
		2	3	1,97 (±0,22)	2,22 (±0,31)	0,37	0,75	1,12	
		1	4	1,04 (±0,23)	3,11 (±0,69)	0,19	1,05	1,24	
		0	5	-	2,94 (±0,91)	-	-	-	
									1,31

CE₅₀: concentração efetiva 50%. CIF: Concentração inibitória fracionária. ΣCIF: somatória dos valores de CIF. XΣCIF: Média da somatória dos valores de CIF. Valores da concentração expressos em µM. Valores representam a média de dois experimentos independentes.

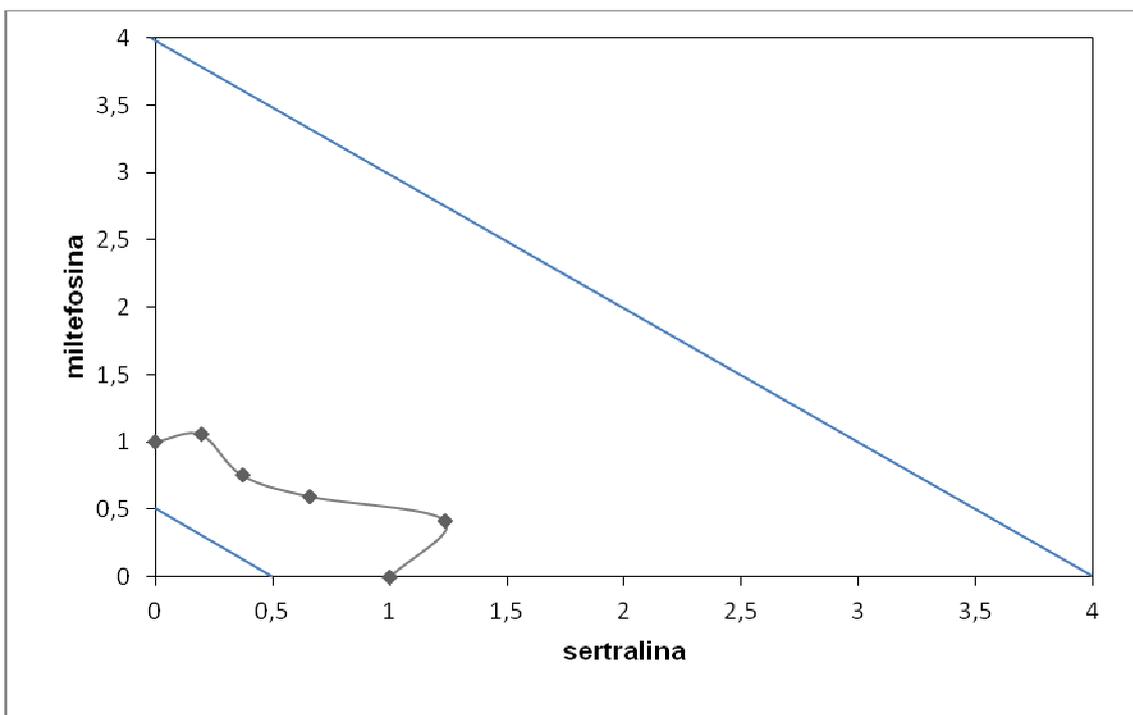


Figura 16: Isobolograma gerado pela da associação entre miltefosina e sertralina na forma amastigota de *Leishmania (L.) infantum*. Valores $\leq 0,5$ indicam associações sinérgicas. Valores entre 0,5 e 4 indicam associações aditivas, ou indiferentes. Valores ≥ 4 indicam associações antagônicas.

4.3. Avaliação do diâmetro, carga da superfície dos lipossomos e eficiência de encapsulação

Os estudos descritos a seguir, foram realizados no Instituto de Física da USP, com a colaboração do Prof. Dr. Leandro Barbosa. Para determinar o diâmetro médio dos lipossomos foi utilizada a técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS), realizada na presença e ausência do fármaco SERT. Os resultados demonstraram um valor de 127,9 nm para LP- SERT e 126,7 nm para a formulação lipossomal sem a inclusão do fármaco, após extrusão. Dentre as características físico-químicas de lipossomos que determinam a interação com

a superfície de células, a carga da superfície da membrana das vesículas vem demonstrando ser de grande importância. Desta forma, a carga dos lipossomos foi avaliada através da calorimetria exploratória diferencial (DSC). Na presença e ausência do fármaco SERT, os dados resultaram em valor negativo de -4,71 mV para o SERT-LP e -4,26 mV para a formulação lipossomal sem fármaco, confirmando a carga negativa da formulação.

4.4. Eficiência de Encapsulação (%EE): Quantificação da SERT nos lipossomos.

A quantificação da SERT nos lipossomos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma curva padrão com o fármaco. A SERT se mostrou muito promissora na formulação lipossomal estudada, uma vez que a porcentagem de encapsulação (%EE) foi de 82%. A curva padrão demonstrou um coeficiente linear (r^2) de 0,99, com a equação $y = 0,0004x + 0,0028$ (Figura 16).

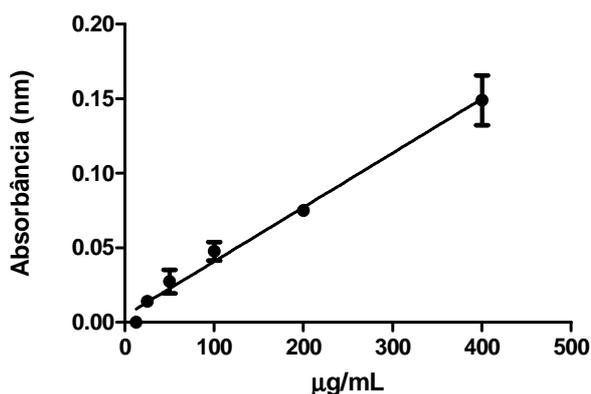


Figura 17: Regressão linear gerada pela sertralina diluída em diferentes concentrações de isopropanol (1,56–100 µg/mL) quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A Figura 17 demonstra o cromatograma (λ 220 nm) da sertralina livre (A) e lipossomal (B), onde foi observado a eluição do fármaco em um tempo de retenção (TR) de 11,8 min.

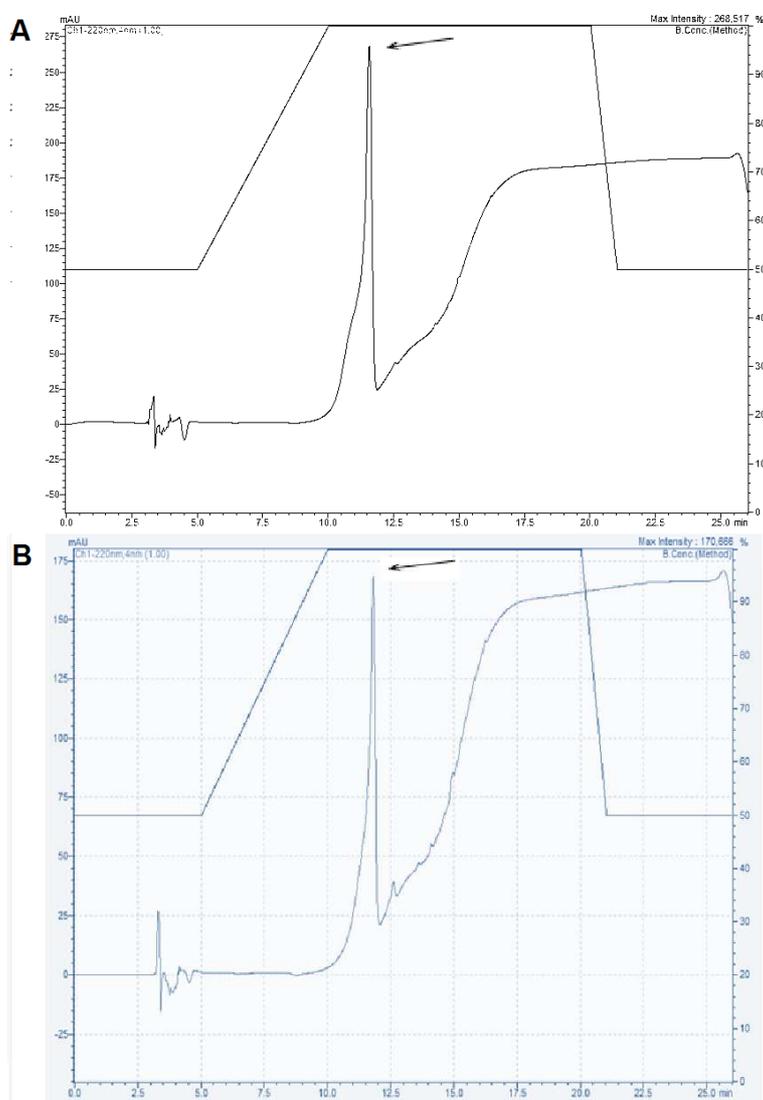


Figura 18: Cromatograma da sertralina livre (A) e lipossomal (B) obtido a 220 nm em CLAE. A corrida foi desenvolvida na presença de metanol (0,01% TFA) em água (0,01% TFA), utilizando coluna C4. O volume de injeção foi de 20 μ L, com uma vazão de 1 mL/min, totalizando um tempo de corrida de 26 minutos. O sinal da sertralina (pico) pode ser observado com tempo de retenção de 11,8 min (seta preta).

4.5. Avaliação *in vitro* da internalização da SERT-LP marcada com Rodamina 123 em macrófagos peritoneais

A interação dos lipossomos com a célula alvo é uma das principais características a se avaliar, quando se quer estudar um sistema de liberação de fármacos. Foi verificada a capacidade de captação dos lipossomos marcados com a sonda fluorescente Rodamina 123 (SERT-LP-R123), por macrófagos peritoneais, utilizando-se citometria de fluxo. Na figura 18 podemos observar que o processo de captação da SERT-LP-R123 ocorre nos 30 minutos iniciais, com uma queda após 1 hora, mas se mantendo sustentada tanto nos macrófagos infectados (vermelho) quanto nos não infectados (preto). Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os grupos, a captação da LP-SERT-R123 pelos macrófagos infectados foi inferior (16%) aos macrófagos não infectados (após 30 min).

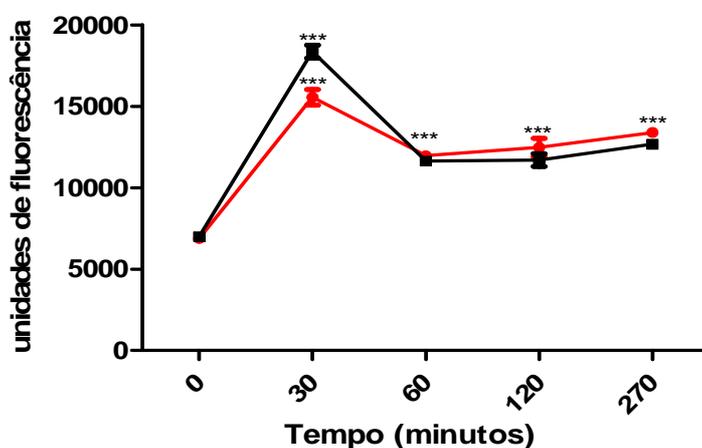


Figura 19: Captação de SERT-LP-R123 por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não por *Leishmania (L.) infantum*. A intensidade da fluorescência expressa por unidades arbitrarias de fluorescência dentro dos macrófagos foi dosada por citometria de fluxo (Attune-Thermofisher) em um total de 270 minutos, utilizando 10.000 eventos para cada tempo (preto - macrófagos não infectados; vermelho- macrófagos infectados). Todos os tempos apresentaram diferença estatística quando comparados com o tempo 0, tanto em macrófagos infectados quanto em macrófagos não infectados ($p < 0,0001$).

4.6. Estudos de Farmacocinética (PK)

A farmacocinética da SERT foi estudada em modelo de hamster, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS). Para isto, contamos com a colaboração do Prof Kevin Read da Universidade de Dundee (Drug Discovery Unit). A SERT foi dissolvida em água e administrada pela via oral na dose de 15 mg/kg à 3 hamsters machos (aprox. 90 gramas/cada). Diferentes tempos de coleta de sangue foram estabelecidos e a SERT pode ser detectada após 30 minutos da administração. Considerando os parâmetros farmacocinéticos, como a área abaixo da curva (AUC), que mede a exposição do fármaco no organismo, observou-se um valor médio de 19.520 ng/min/mL, uma concentração plasmática máxima (C_{max}) de 27 ng/mL e um tempo máximo para atingir o C_{max} (T_{max}) de 4 horas. Com base na Figura 19 pode-se prever uma meia vida plasmática ($T_{1/2}$) de aproximadamente 8 horas, porém, a meia vida plasmática terminal ($T_{1/2}$ terminal) foi bastante prolongada (>24 h), onde se pôde verificar que mesmo após 24 horas, a sertralina ainda estava presente a 7 ng/mL. Com base nos valores de C_{max} em hamster pela via oral, observa-se que a sertralina atingiu uma concentração plasmática máxima de 24 ng/mL, valor este aproximadamente 200 vezes inferior aos valores de CE_{50} determinados *in vitro* para amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*.

Os dados obtidos neste estudo permitiram o estabelecimento do regime de uma dose única diária administrada em nossos modelos experimental, evitando toxicidade do fármaco ao animal.

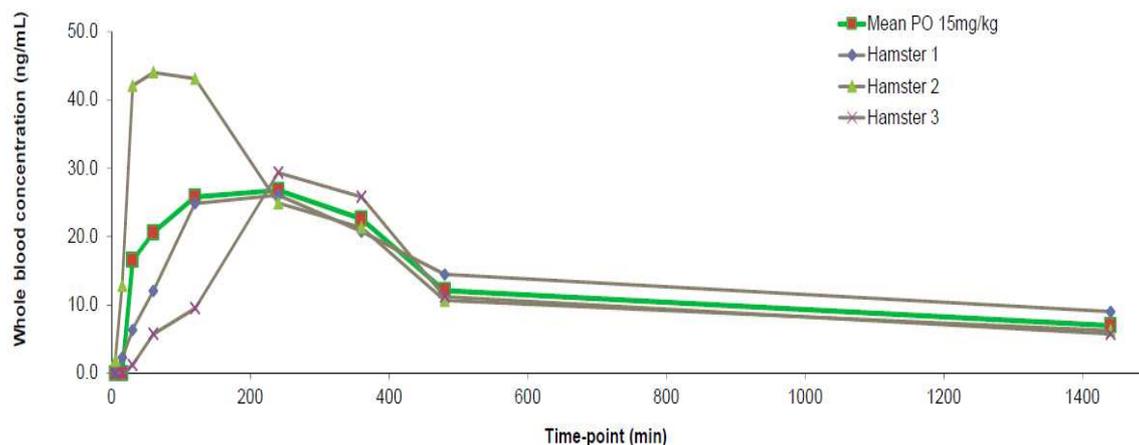


Figura 20: Estudo farmacocinético da sertralina livre (15 mg/kg) em modelo de hamster, administrada a 15 mg/kg. Análise realizada em CLAE-EM.

4.7. Avaliação *in vivo* da eficácia da SERT pela via de administração oral

O tratamento com SERT oral foi realizado em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum*, após 5 dias de infecção (d.p.i.). A SERT foi administrada por 10 dias consecutivos, utilizando-se 4 diferentes doses (0,3; 1; 5 e 15mg/kg). Ao grupo controle, foi administrado apenas o veículo sem o fármaco SERT. No 11^o d.p.i., os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ para remoção do fígado. Posteriormente o órgão foi pesado e macerado para avaliação da carga parasitária de cada grupo por diluição limitante. As leituras em microscopia óptica foram realizadas no 7^o e 14^o de incubação.

Conforme observado na Figura 20, não foi verificada eficácia da SERT livre após o tratamento oral, uma vez que as doses de 0,3; 1; 5 e 15 mg/kg, apresentaram cargas parasitárias similares ao grupo controle não tratado.

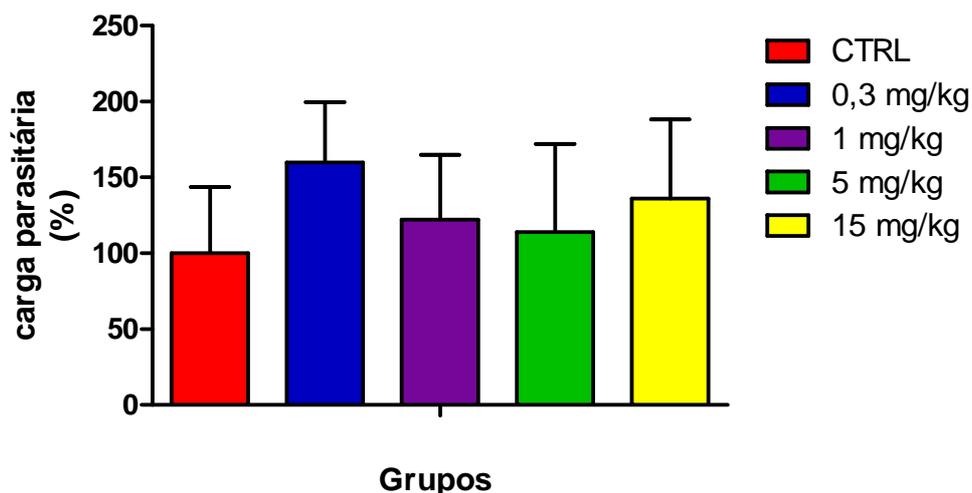


Figura 21: Carga parasitária do fígado camundongos BALB/c infectados com *Leishmania* (L.) *infantum* após 10 dias de tratamento com a SERT pela via de administração oral.

4.8. Avaliação *in vivo* da eficácia da SERT-LP pela via de administração subcutânea

Após encapsulação da SERT nos lipossomos, caracterização de seu perfil físico-químico (carga e tamanho) e dosagem por CLAE, o fármaco foi administrado pela via subcutânea após 5 dias de infecção dos camundongos, com regime de tratamento por 10 dias consecutivos nas mesmas doses anteriores (0,3; 1; 5 e 15 mg/kg) e foi realizada a administração do lipossomo sem o fármaco para verificar possível tratamento pelo lipossomo. Na figura 21, é possível observar que a SERT - LP foi capaz de reduzir a carga parasitária em 72% no grupo tratado a 0,3 mg/kg, 89% no grupo de 1 mg/kg e 71% no grupo tratado a 5 mg/kg. Ainda que não significativo estatisticamente ($p > 0,05$), a carga parasitária no grupo tratado a 15 mg/kg, apresentou um aumento de 100% em relação ao grupo não tratado (controle). O grupo tratado somente com o lipossomo (sem a adição da SERT) não apresentou redução da carga parasitária quando comparado ao grupo controle.

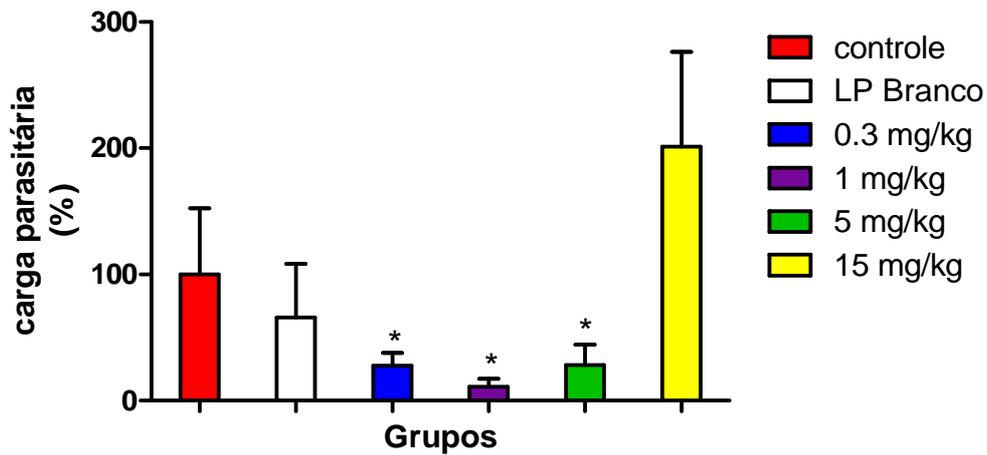


Figura 22: Carga parasitária do fígado camundongos BALB/c infectados com *Leishmania* (L.) *infantum* após 10 dias de tratamento com a SERT-LP pela via de administração subcutânea * $p < 0,05$.

4.9. Avaliação *in vivo* da eficácia da SERT livre pela via administração subcutânea

Considerando a falha terapêutica da SERT livre pela via oral, nosso objetivo se concentrou na encapsulação do fármaco em uma formulação nanolipossomal para direcionamento dirigido aos macrófagos infectados no fígado. Para isto, considerando a via de administração preferencial desta formulação a subcutânea, foi realizado como controle do estudo anterior um estudo da eficácia deste fármaco livre, administrado pela mesma via.

No 5º dia pós infecção (d.p.i.), a SERT livre foi administrada por 10 dias consecutivos pela via subcutânea nas mesmas doses estudadas anteriormente (0,3; 1; 5 e 15 mg/kg). Na Figura 22 foi possível verificar que não houve redução da carga parasitária nos grupos tratados, exceto pelo grupo tratado a 15 mg/kg, em que houve uma redução da carga parasitária em 86%, porém não houve diferença estatística significativa. Já o grupo tratado à 0,3 mg/kg apresentou um aumento da carga parasitária em relação ao grupo controle.

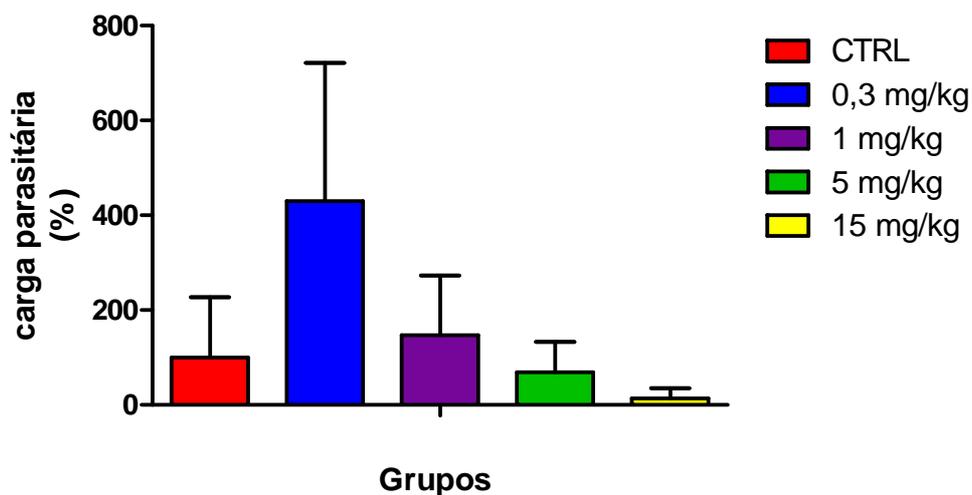


Figura 23: Carga parasitária do fígado camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum* após 10 dias de tratamento com a SERT pela via de administração subcutânea.

4.10. Determinação da resposta celular

Devido ao inesperado aumento da carga parasitária no grupo tratado com a SERT-LP a 15mg/kg, foi realizada uma análise de citocinas do sobrenadante do macerado do fígado e em soro dos camundongos. Nas amostras de sobrenadante do macerado, não foi observada diferença estatística significativa em relação às citocinas estudadas. Porém, quando essas mesmas citocinas foram analisadas em amostras de soro, foi observada diferenças na produção da citocina IL-6 e da quimiocina MCP-1 em relação ao grupo infectado não tratado. Outras citocinas presentes no kit *cba* (IL-4, INF- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12p70) não foram detectadas no soro dos animais.

O tratamento a 1 mg/kg de SERT-LP reduziu os níveis de IL-6 em 50% ($p < 0,05$); porém na dose de 15 mg/kg, observou-se um aumento significativo, elevando os níveis em 5x ($p < 0,05$) de IL-6 (Figura 23). A SERT foi demonstrada como forte indutora na produção de MCP-1 em estudo clínico com pacientes com depressão. Em nossos estudos, estes dados se confirmaram no modelo murino, onde a produção de MCP-1 foi bastante

elevada nos grupos tratados com a SERT-LP nas doses de 15 mg/kg e 1 mg/kg, não havendo diferença estatística entre estes grupos, porém com diferença estatística em relação ao grupo controle.

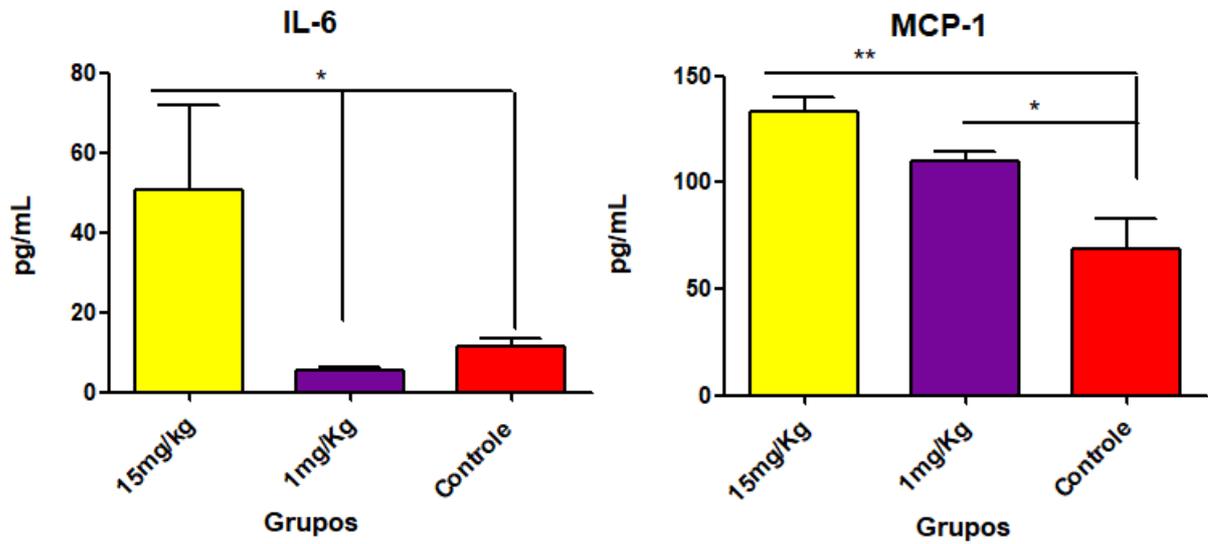


Figura 24: Avaliação dos níveis séricos da citocina IL-6 (A) e da quimiocina MCP-1 (B) em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum* e tratados por 10 dias consecutivos com SERT-LP nas doses de 1 e 15 mg/kg. Os níveis de citocinas (pg/mL) foram determinados por citometria de fluxo pelo kit CBA (*cytometric beads array*). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). Foram considerados 10.000 eventos por análise.

4.11. Caracterização histopatológica

Foi realizado um estudo histopatológico do fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* e tratados por 10 dias consecutivos com SERT-LP nas doses de 1 e 15 mg/kg. Utilizou-se um grupo controle infectado e não tratado para se avaliar as possíveis lesões causadas pela LV. Após 1 dia do término do tratamento (16 d.p.i.), os animais foram eutanasiados e os órgãos avaliados. Em ambos os grupos tratados foram observados, no fígado, múltiplos focos de esboços granulomatosos com distribuição aleatória em parênquima, caracterizados por macrófagos epitelióides centrais, linfócitos e plasmócitos periféricos (Figura 24 e figura 25), além de discreta degeneração hidrópica difusa de hepatócitos. No baço, evidencia-se presença de hiperplasia linfóide reativa discreta a moderada, difusa, com folículos linfóides coalescentes (Figura 26 e figura 27). E um dos casos, observou-se agregado de neutrófilos em parênquima, esplenite eosinofílica discreta, focal. Estes resultados não diferiram daqueles observados no grupo não tratado.

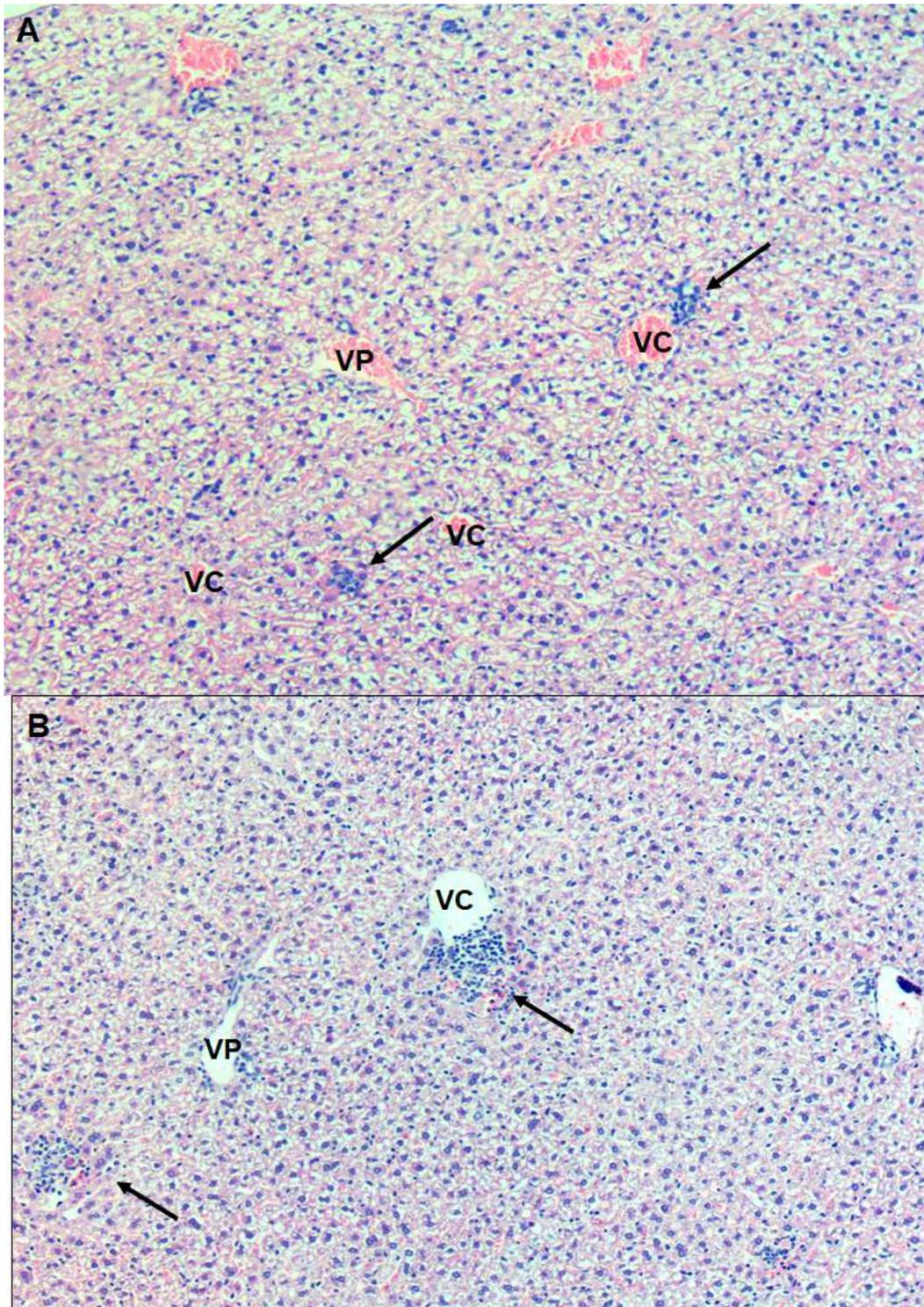


Figura 25: Avaliação histopatológica de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*, após 10 dias consecutivos de tratamento com sertralina lipossomal. **A:** Imagem representativa do **fígado** do grupo **controle** (infectado, não tratado), observa-se múltiplos focos aleatórios de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, formando esboços granulomatosos, em parênquima hepático (seta). Aumento de 100x. **B:** Imagem representativa do **fígado** de animais tratados com sertralina lipossomal à **1 mg/kg**. Observa-se múltiplos focos aleatórios de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, formando esboços granulomatosos, em parênquima hepático (seta). Aumento de 100x. **VC:** veia xentrolobular; **VP:** veia porta. Coloração de H&E.

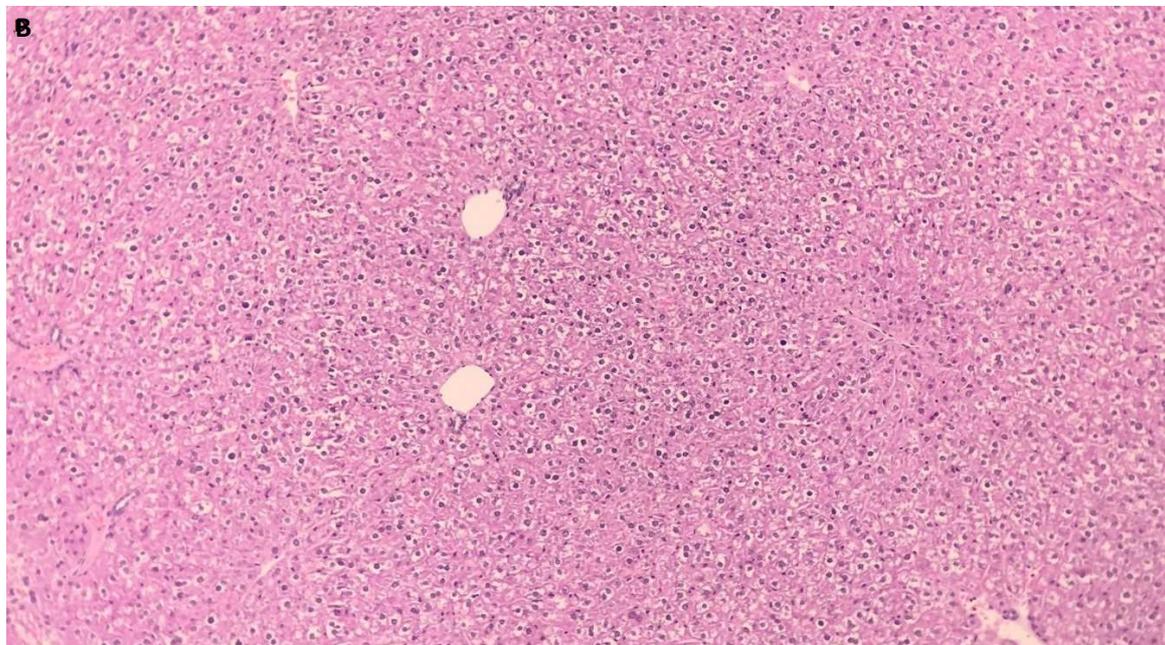
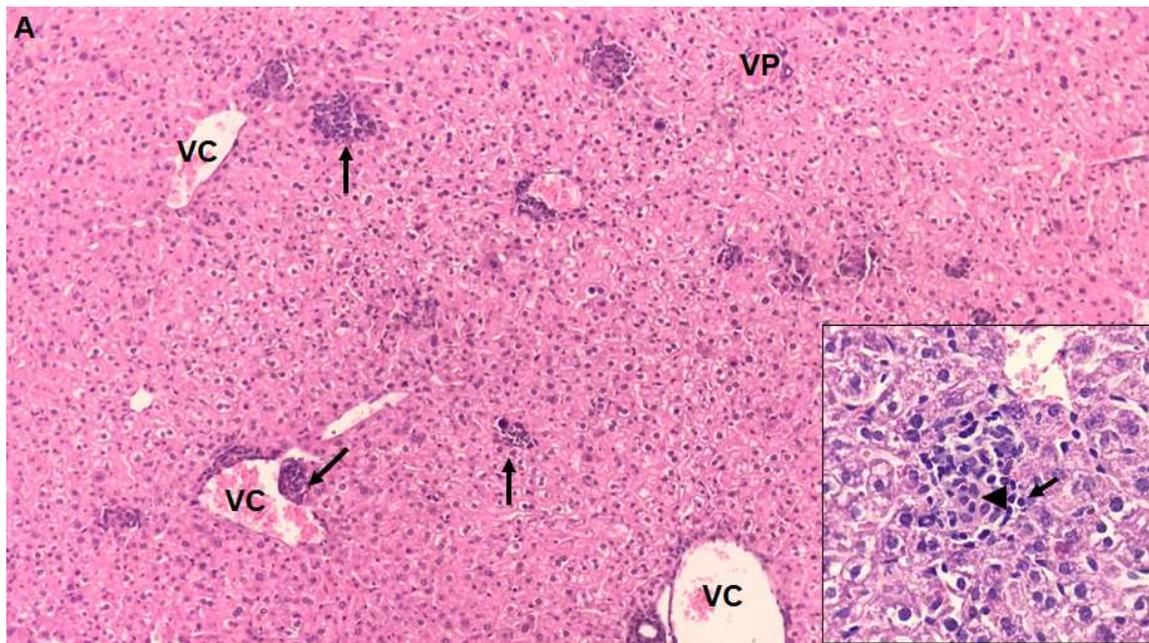


Figura 26: Avaliação histopatológica de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*, após 10 dias consecutivos de tratamento com sertralina lipossomal. **A:** Imagem representativa do **fígado** do grupo tratado com sertralina lipossomal à **15 mg/kg**, observa-se múltiplos focos aleatórios de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, formando esboços granulomatosos, em parênquima hepático (seta), aumento de 100x. **VC:** veia centrolobular; **VP:** veia porta. Em **detalhe**, observa-se foco de infiltrado inflamatório caracterizado por linfócitos (seta) e macrófagos epitelióides (cabeça de seta) em parênquima hepático, aumento de 400x.. **B:** Imagem representativa do **fígado** do grupo não tratado e não infectado. Setas- múltiplos focos de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, formando esboços granulomatosos, em parênquima hepático. Coloração H&E. Aumento 100x.

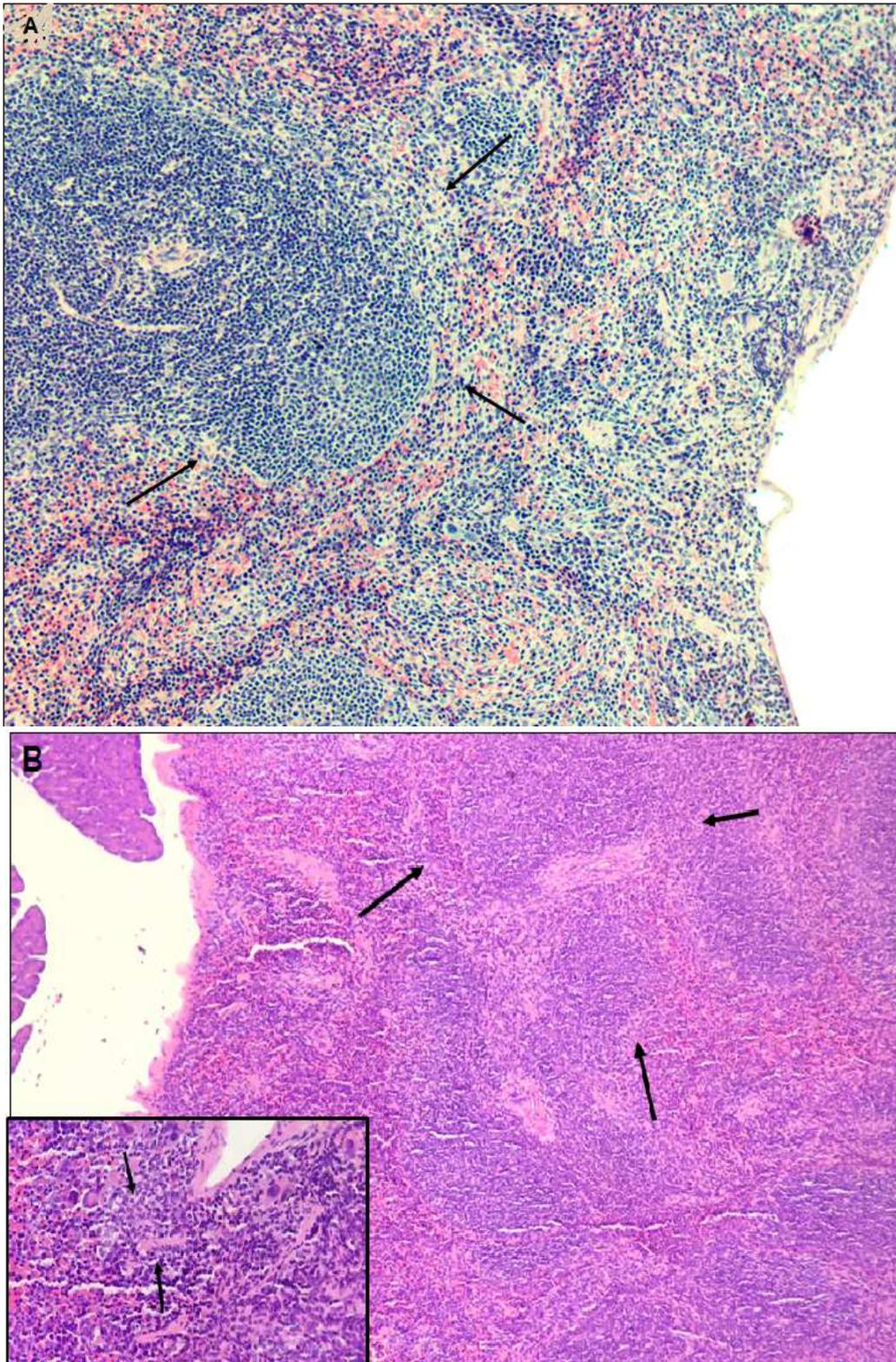


Figura 27: Avaliação histopatológica de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*, após 10 dias consecutivos de tratamento com sertralina lipossomal. **A-** Imagem representativa do **baço** do grupo controle não tratado, observa-se hiperplasia linfóide reativa. **B:** Imagem representativa do **baço** do grupo tratado com sertralina lipossomal à **1 mg/kg**. Observa-se hiperplasia linfóide reativa, aumento de 100x. Em **detalhe:** Esplenite neutrofílica, discreta, aumento 400x. Coloração H&E.

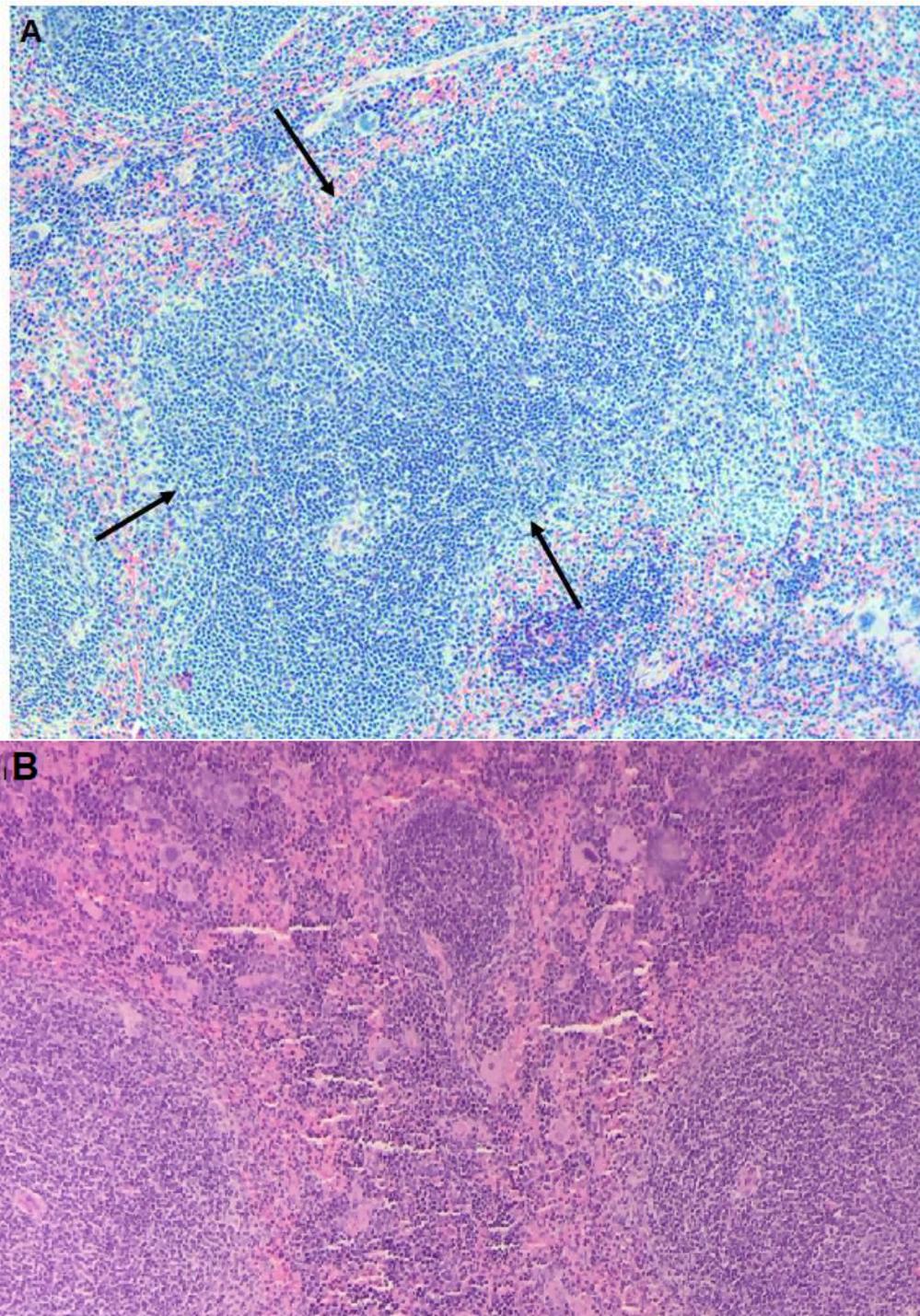


Figura 28: Avaliação histopatológica de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*, após 10 dias consecutivos de tratamento com sertralina lipossomal. **A:** Imagem representativa do **baço** de animais tratados com sertralina lipossomal à **15 mg/kg**, observa-se hiperplasia linfóide reativa, com folículos linfóides coalescentes, aumento 100x. **D-** Imagem representativa do **baço** de um animal não infectado, não tratado, baço apresentando aspectos normais, com polpa branca em tamanho esperado, aumento 100x. Coloração H&E.

4.12. Biodistribuição

A SERT foi internalizada em lipossomos de fosfatidilserina que foram marcados com o fluoróforo DIL C18. Os animais infectados com *Leishmania (L.) infantum* foram tratados e após 0, 12 (Figura 28), 24 e 48 horas (Figura 29) foram removidos o baço e o fígado para verificar se os lipossomos atingiram os órgãos nos tempos determinados. Após 12 horas de tratamento, já foi possível observar a presença de lipossomos distribuídos em ambos órgãos.

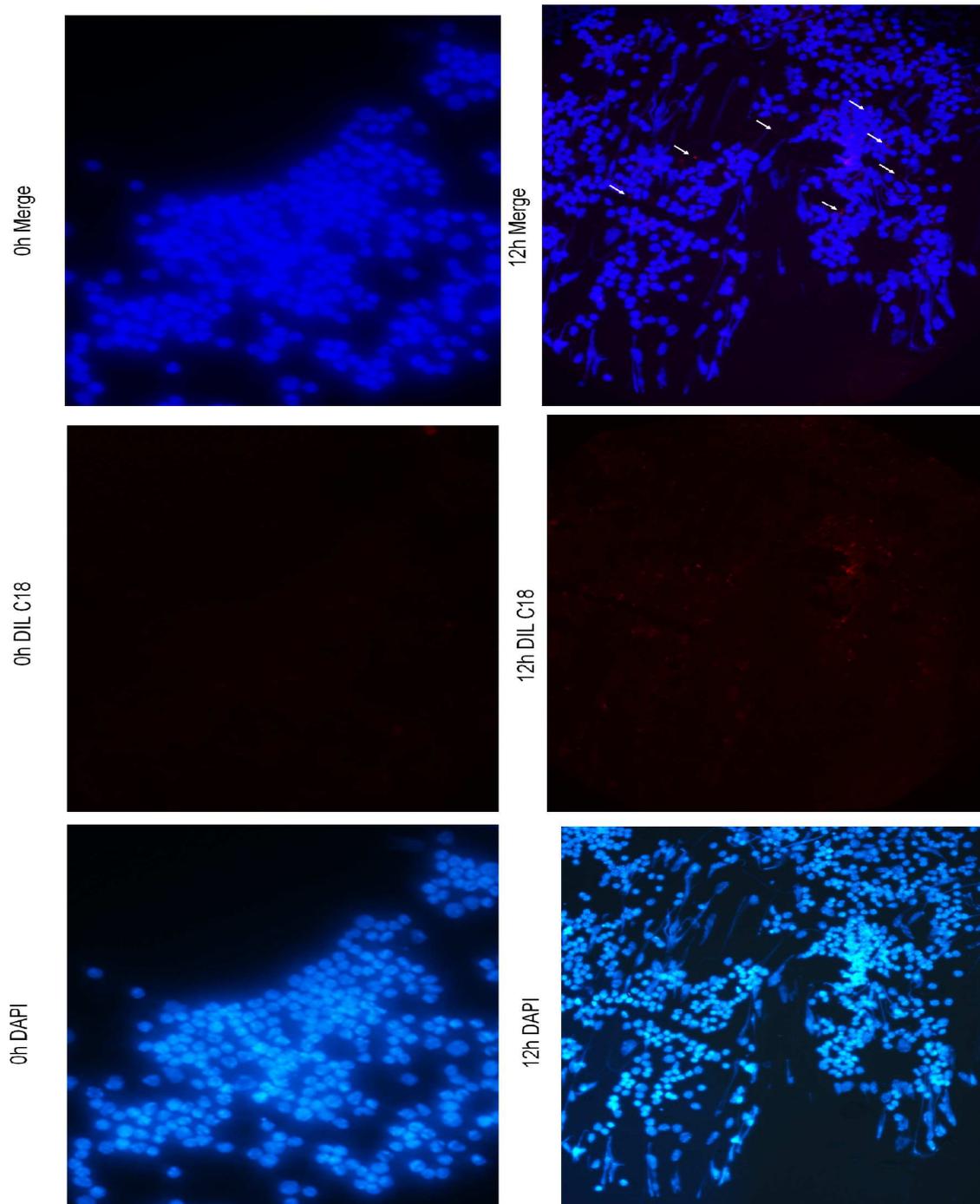


Figura 29: Fotos representativas de imprint de baço adquiridas em microscópio de fluorescência. Distribuição de lipossomos (seta) marcados com DIL C18 contendo sertralina em baço de camundongo BALB/c. Dez dias após a infecção, os animais foram tratados com SERT-LP, e tiveram o baço removido, realizados imprinting e as amostras foram submetidas à análises de imunofluorescência. Células nucleadas marcadas com DAPI (azul). Lipossomos marcados com DIL C18 (vermelho).

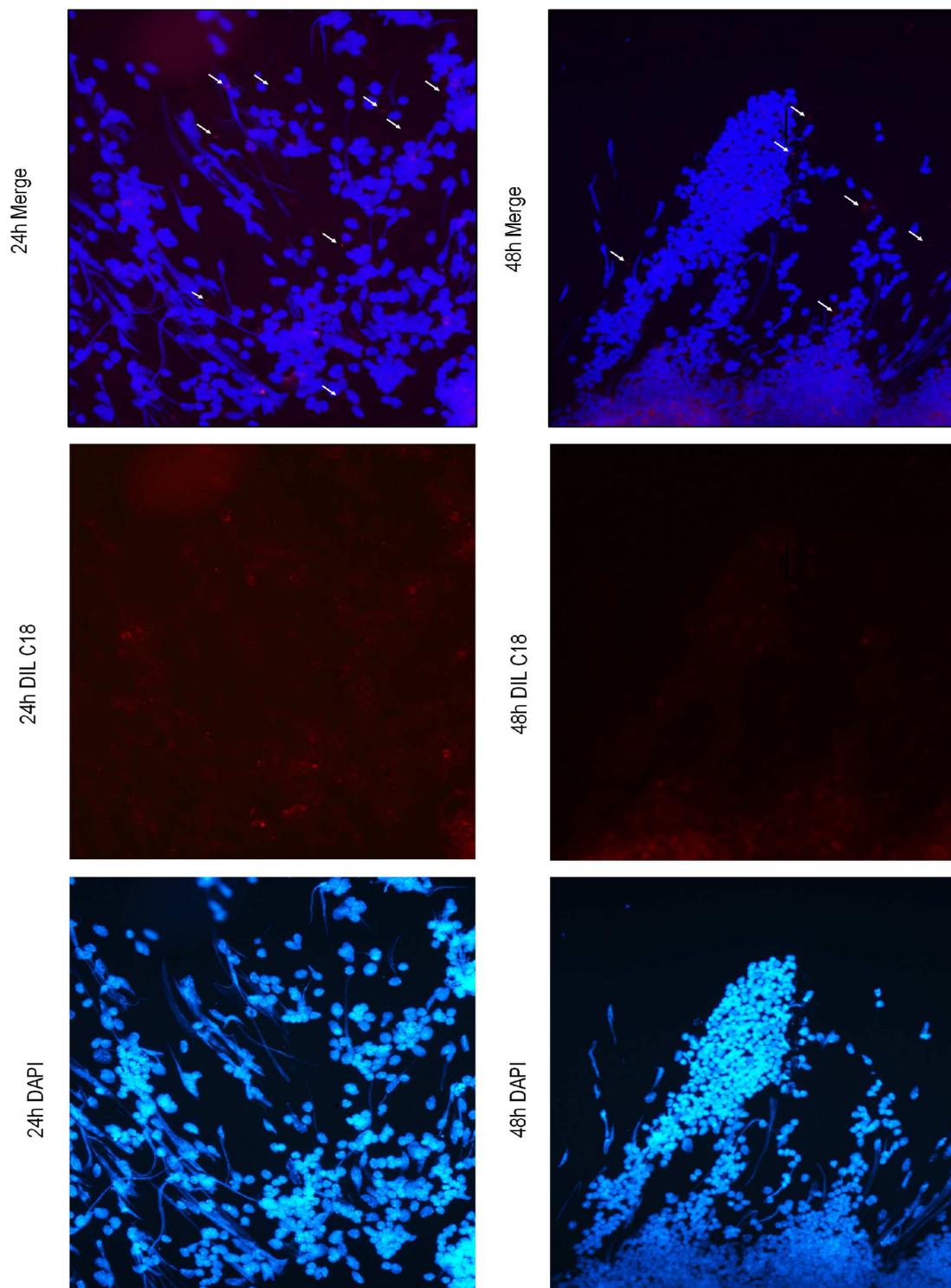


Figura 30: Fotos representativas de imprint de baço adquiridas em microscópio de fluorescência. Distribuição de lipossomos (seta) marcados com DIL C18 contendo sertralina em baço de camundongo BALB/c. Dez dias após a infecção, os animais foram tratados com SERT-LP, e tiveram o baço e fígado removidos, realizados imprinting de cada órgão e as amostras submetidas à análises de imunofluorescência. Células nucleadas marcadas com DAPI (azul). Lipossomos marcados com DIL C18 (vermelho). C: 24 horas de tratamento. D: 48 horas de tratamento.

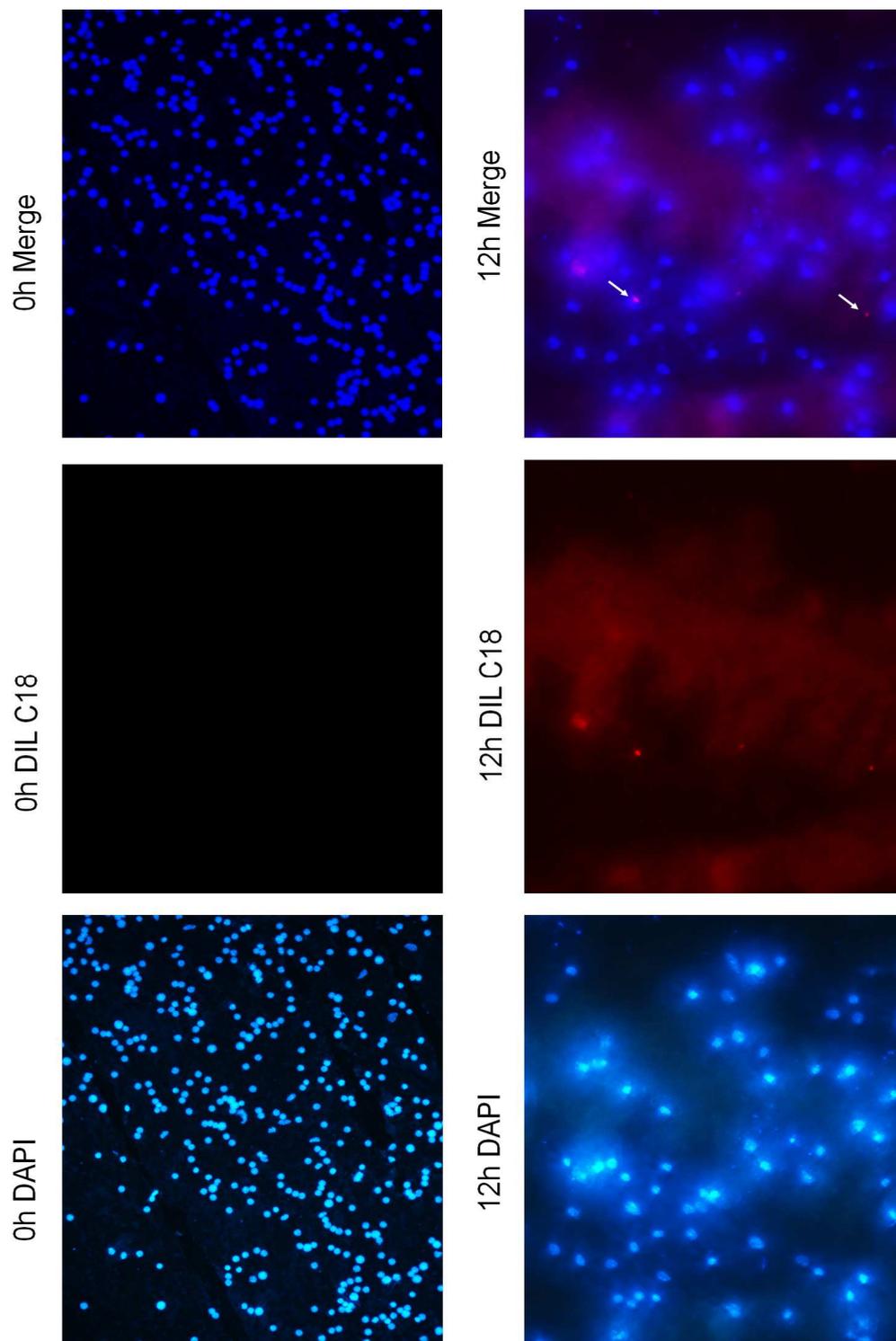


Figura 31: Fotos representativas de imprint de fígado adquiridas em microscópio de fluorescência. Distribuição de lipossomos (seta) marcados com DIL C18 contendo sertralina em fígado de camundongo BALB/c. Dez dias após a infecção, os animais foram tratados com SERT-LP, e tiveram o fígado removido, realizados imprinting e as amostras foram submetidas à análises de imunofluorescência. Células nucleadas marcadas com DAPI (azul). Lipossomos marcados com DIL C18 (vermelho).

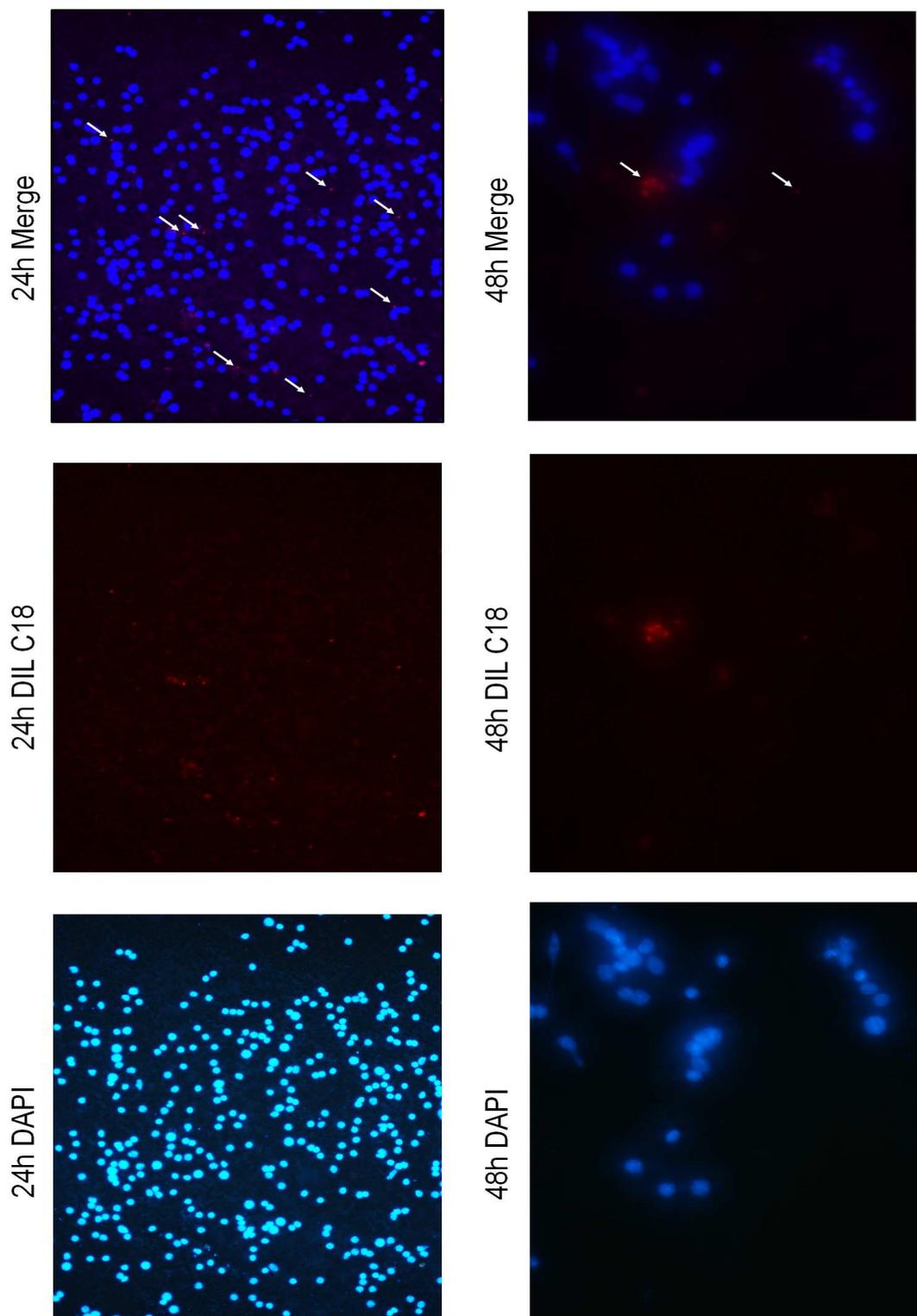


Figura 32: Fotos representativas de imprint de fígado adquiridas em microscópio de fluorescência. Distribuição de lipossomos (seta) marcados com DIL C18 contendo sertralina em fígado de camundongo BALB/c. Dez dias após a infecção, os animais foram tratados com SERT-LP, e tiveram o fígado removido, realizados imprinting e as amostras foram submetidas à análises de imunofluorescência. Células nucleadas marcadas com DAPI (azul). Lipossomos marcados com DIL C18 (vermelho).

5. Discussão

A leishmaniose visceral continua afetando milhões de pessoas no mundo todo, e ainda se encontra com poucas opções terapêuticas seguras para o tratamento de pacientes. Por isso, o reposicionamento de fármacos se faz uma abordagem a ser considerada, uma vez que os medicamentos já foram aprovados e se encontram disponíveis no mercado, reduzindo tempo e custo das pesquisas.

Dados da literatura já demonstraram que antidepressivos apresentam atividade antiparasitária (Palit, 2008; Mukherjee, 2012). Estudo anterior, *in vivo* em *Leishmania* (L.) *donovani* demonstrou que SERT eliminou 72% e 70% da carga parasitária no baço e no fígado, respectivamente, de camundongos BALB/c previamente infectados (Palit, 2008). SERT, um inibidor da recaptura da serotonina, já se encontra aprovado pelo FDA e atualmente é utilizado para o tratamento de depressão (Santuzzi et al, 2012; Onaolopo et al, 2017). Em nosso estudo, o potencial terapêutico da SERT foi avaliado contra as formas promastigotas e amastigotas intracelulares, juntamente com ensaios de eficácia *in vivo* tanto na forma livre, quanto encapsulada em nanolipossomos (SERT-LP) para o tratamento da leishmaniose visceral.

SERT foi eficaz contra as formas promastigotas, sendo cerca de 22 vezes mais ativo do que a miltefosina. Apesar de apresentar toxicidade para células de mamífero, a SERT eliminou 100% dos amastigotas intracelulares com atividade similar à miltefosina (fármaco padrão), resultando em um Índice de Seletividade de 6. Palit e colaboradores (2008) demonstraram anteriormente a atividade anti-*Leishmania* (L.) *donovani* da SERT, com uma CE_{50} de aproximadamente 1,6 vezes menor em amastigotas e 10 vezes menor em promastigotas. Diferentes espécies de *Leishmania* podem apresentar diferentes susceptibilidades à fármacos.

Estudos mostram que a associação de fármacos traz benefícios relevantes na terapia contra diversas doenças, diminuindo os efeitos adversos e o risco de resistência, aumentando a eficácia e a aderência do paciente ao tratamento, e reduzindo os custos e o tempo de tratamento (Rahman et al, 2017). Além disso, a associação de fármacos vem sendo amplamente explorada em diferentes áreas, como a terapia antiviral (Pai et al, 2017), antibacterina (Cai et al, 2017), antitumoral (Ram et al, 2017), assim como antiparasitários, especialmente para o tratamento contra malária (Abuaku et al, 2017) e leishmanioses (Hendrickx et al, 2017).

Além de se considerar a potente atividade da SERT em nosso modelo *in vitro*, este fármaco apresenta características desejáveis para uma possível associação terapêutica com o fármaco miltefosina, como: i) é um fármaco aprovado de administração oral; ii) é um fármaco extensamente metabolizado pelo fígado (CYP 2B6, e em menor contribuição CYP2C19, CYP3A4 e CYP2D6) (DrugBank, 2014). Com base nestes dados de metabolização, interações metabólicas fármaco-fármaco em nível de CYP450 não são esperadas quando administrada juntamente com a miltefosina, uma vez que a única possibilidade de metabolização da miltefosina faz-se por fosfolipases (Dorlo et al, 2012). Nossos estudos de associação *in vitro*, demonstraram que a SERT, quando associada ao fármaco MIL em amastigotas intracelulares, resultou em uma média da somatória da concentração inibitória fracionária entre 0,5 e 4, demonstrando segundo Odds (2003), um efeito aditivo (ou indiferente).

Estudos de farmacocinética (PK) proporcionam informações essenciais sobre a distribuição de um fármaco no organismo, incluindo sua disponibilidade no sangue e tecidos. Recentemente, pesquisadores da farmacêutica Novartis, publicaram um artigo sugerindo um novo modelo de *Drug Discovery*, onde a farmacocinética é avaliada logo no princípio do estudo (Tuntland, 2014), fornecendo dados para a melhoria dos ensaios de eficácia *in vivo*. Dados estes que incluem tempo de meia vida plasmática ($T_{1/2}$), concentração plasmática máxima (C_{max}), tempo para atingir a C_{max} (T_{max}), e a área abaixo da curva

(AUC), a qual informa a exposição total do fármaco no organismo. Possibilita-se assim, um planejamento racional do estudo experimental, como adequação de doses diárias e intervalos entre as doses, minimizando o número de animais utilizados, diminuindo a toxicidade no organismo e aumentando as chances de êxito do estudo. Nossos resultados com SERT em modelo de hamster, possibilitaram a adequação das doses nos camundongos com intervalos de 24 horas, dada a longa eliminação do fármaco no organismo (meia vida plasmática terminal). A SERT, quando administrada pela via oral, apresentou baixos níveis plasmáticos (C_{max}), incompatíveis com o valor de CE_{50} *in vitro* encontrado nos amastigotas intracelulares; concentrações 148 vezes menores que CE_{50} foram observados no plasma. A partir destes dados, já se poderia prever uma possível falha terapêutica da SERT no modelo de LV animal, porém, alguns fármacos desempenham sua atividade biológica em seus respectivos alvos, após múltiplas exposições, acumulando-se no sítio de ação com doses repetidas (Scheerans et al, 2015). Já foi observado que a atividade central antidepressiva da SERT é obtida apenas por volta da terceira semana após início do tratamento (Santuzzi, 2012), possivelmente por necessitar de um acúmulo no sítio de ação. Nossos estudos em modelo murino corroboram os dados de $T_{1/2}$ da SERT em humanos. Alderman e colaboradores (1998) demonstraram que a SERT apresenta $T_{1/2}$ de aproximadamente 7 horas, com meia vida plasmática terminal de mais de 26 horas; estes dados sugerem que a SERT deva ser administrada uma vez ao dia (Murdoch e McTavish, 1992).

Com base em nossos dados de PK, iniciamos os estudos de eficácia *in vivo* da SERT oral em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania* (L.) *infantum*. O tratamento não apresentou redução da carga parasitária em nenhum dos grupos tratados. Este fato pode ser explicado por alguns fatores, como: i) baixa absorção oral a 15 mg/kg quando administrada em veículo como a água; ii) níveis plasmáticos baixos de SERT observados nos estudos de PK; iii) problemas relacionados à biodistribuição, gerando baixas concentrações teciduais do fármaco em órgãos-alvo (fígado); iv) a SERT é metabolizada para a desmetilsertralina no fígado, e este pode ser inativo contra *Leishmania* (L.)

infantum. Considerando a falha terapêutica da SERT oral, não houve planejamento de ensaios de associação *in vivo* deste fármaco com a miltefosina. Porém, foi aventada a hipótese de utilização de transportadores de fármacos para direcionamento seletivo da SERT ao fígado e baço, proporcionando não só o direcionamento às células-alvo, como protegendo o fármaco da metabolização hepática antes de atingir os parasitas.

Sistemas de direcionamento seletivo de fármacos como lipossomos, vêm sendo amplamente utilizados na área farmacêutica. Na clínica da leishmaniose, já se empregam formulações lipossomais há muitos anos, como a anfotericina B (AmBisome), reduzindo doses e aumentando o índice terapêutico (Akbaru, 2017). No presente estudo, foi observado que a encapsulação do fármaco SERT em nanolipossomos de carga negativa, resultou em uma eficácia do fármaco no modelo animal, reduzindo em mais de 70% a carga parasitária no fígado na dose abaixo e igual a 1 mg/kg. A dose de 1 mg/kg eliminou 86% da carga parasitária. Não houve maior eficácia do tratamento quando doses 5 vezes mais elevadas (5 mg/kg) foram administradas, sugerindo a eficácia da formulação em doses mais baixas por possível direcionamento do fármaco ao fígado. Já na maior dose administrada (15 mg/kg), foi observada a exacerbação da carga parasitária (100% em relação ao grupo controle). O aumento da carga parasitária pode estar relacionado ao aumento da citocina IL-6, uma citocina pró inflamatória (Murray, 2008). Os níveis elevados dessa citocina estão diretamente relacionados à letalidade nos casos de LV. A IL-6 inibe diretamente a produção de TNF- α e suprime respostas Th1 podendo induzir respostas Th2, regulando, assim, de maneira negativa a atividade do macrófago contra o parasito (Barral-Neto et al, 1991; Laurenti, 2010; Santos et al., 2015). Ansari e colaboradores (2006) realizaram um estudo com soro de pacientes infectados com LV, e relataram um aumento dos níveis de IL-6 relacionado com a forma progressiva da doença. Murray (2008) observou que camundongos privados de IL-6 obtiveram um tratamento mais efetivo quando administrado tanto os antimoniais pentavalente quanto quando administrado anfotericina B.

Além da citocina IL-6, em nosso estudo foi observado um aumento de MCP-1 no soro dos camundongos tratados a 1 e 15 mg/kg com a SERT-LP, uma quimiocina produzida por macrófagos, células dendríticas e monócitos. A MCP-1 é um fator quimiotático para monócitos, células T e células natural killer (Deshmane, 2009), importante para a formação de granulomas no fígado, contribuindo na remoção dos parasitas (Cotterell et al., 1999; Dey et al., 2007). Os resultados obtidos do estudo de caracterização histopatológica, indicaram um aumento das células de defesa, especificamente macrófagos derivados da medula óssea, linfócitos, monócitos e demais células dendríticas relacionadas ao sistema imune, além da presença de granulomas no fígado, e hiperplasia linfóide no baço. Este fato pode estar relacionado a uma possível estratégia do organismo para ativar uma resposta contra o parasita. Estes dados corroboram o aumento da quimiocina MCP-1 observada pela citometria de fluxo e demonstra capacidade da SERT-LP de eliminação da *Leishmania (L.) infantum* no modelo murino em baixas doses. Apesar da redução da carga parasitária promovida pela SERT-LP após 10 dias de tratamento, observou-se ainda a presença do granuloma no fígado e de hiperplasia linfóide no baço ao final do estudo. Este fato pode estar relacionado ao curto tempo de tratamento administrado em nosso estudo, impossibilitando uma adequada regeneração dos tecidos neste período.

Em nossos estudos, utilizamos como controle a sertralina livre, porém, administrada pela mesma via dos lipossomos, a subcutânea. Nossos dados demonstram que sertralina não foi capaz de reduzir a carga parasitária no fígado nas doses inferiores a 15 mg/kg. Porém, na dose de 15 mg/kg foi observado uma redução, ainda que não estatisticamente significativa em relação ao controle não tratado, da carga parasitária no órgão. Estes dados demonstram que a sertralina livre é capaz também de atingir o fígado e eliminar os parasitas, porém, em doses bastante elevadas, corroborando nossos dados de PK. Considerando o índice HED para a conversão de doses “homem↔animal”, que leva em consideração a área de superfície corporal e o peso (Kg) dos organismos estudados, observa-se que a dose administrada de 15 mg/kg, atingiu o limite para o modelo murino (camundongo). Para o ser

humano, a dose equivalente seria de 1,22 mg/kg, sendo que doses máximas de 3,3 mg/kg são administradas, porém, com aumento significativo de efeitos adversos.

Dentre as características físico-químicas ideais de um lipossomo para a LV, destaca-se sua carga de superfície e tamanho. Estudos físico-químicos da formulação de SERT-LP demonstram uma formulação nanolipossomal de carga negativa. Lipossomos negativamente carregados com fosfatidilserina resultaram em uma maior captação pelos macrófagos, por meio de receptores scavengers (SRs), o que resulta em uma melhor eficácia contra *Leishmania* tanto *in vitro* (Tempone et al., 2004) quanto *in vivo* (Walton et al., 2010; Tempone et al., 2010). Além disso, a carga negativa impede que essas vesículas se agreguem evitando uma possível desestabilização da formulação (Walton et al., 2010). Outra característica importante de um lipossomo é o seu tamanho; sabe-se que lipossomos grandes (>400 nm) são removidos da circulação de forma mais rápida quando comparados aos lipossomos pequenos (<400 nm) (Laverman et al., 1999). Considerando a localização da *Leishmania infantum* no organismo, no interior de células do sistema fagocítico mononuclear localizadas no baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Faleiro et al., 2014), se faz importante o planejamento de nanoformulações, objetivando o direcionamento aos sítios-alvo. Reimão e colaboradores (2012) demonstraram que lipossomos menores de 200 nm foram capazes de reduzir 80% da carga parasitária na medula óssea de hamsters previamente infectados com *Leishmania (L.) infantum*.

A determinação de parâmetros farmacocinéticos (PK) de um fármaco, contribuem para uma melhor compreensão de sua biodisponibilidade. Porém, a via de administração influencia diretamente o sucesso ou falha terapêutica. Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que a via subcutânea propiciou uma melhor eficácia de nanolipossomos negativos encapsulados com o fármaco buparvaquona na LV experimental, quando comparados a via intramuscular e intravenosa (Costa-Silva et al., 2017). Considerando a eficácia da SERT-LP em reduzir a carga parasitária no fígado e baço dos camundongos

infectados com *Leishmania (L.) infantum*, realizamos um estudo de biodistribuição desta formulação, marcada com uma sonda fluorescente. No período entre 12 a 48 horas após a administração, foi possível observar a SERT-LP no fígado e no baço dos animais previamente infectados, utilizando um microscópio de fluorescência. Estes dados demonstram que os lipossomos cumpriram um papel fundamental no direcionamento da sertralina, uma vez que a SERT-LP atingiu os órgãos-alvo da *Leishmania*, possivelmente, liberando o fármaco no local ou nos arredores das células hospedeiras quando administrados pela via subcutânea. Dhanikula e colaboradores (2005), demonstraram que os parâmetros farmacocinéticos de uma formulação lipossomal de paclitaxel, foram bastante distintos quando administrados pela via subcutânea (SC) e pela via intravenosa (IV); sua biodisponibilidade foi melhorada pela via SC, passando de uma meia vida plasmática ($T_{1/2}$) de 3h (IV) para 18h (SC). Allen e colaboradores (1993), observaram a administração de lipossomos por diferentes vias de administração (subcutânea, intravenosa e intraperitoneal), e verificaram que lipossomos convencionais administrados pela via SC, estavam intactos na circulação sanguínea após a passagem pelas cadeias de linfonodos do local de administração. Estes fatores, podem ter contribuído para o êxito da SERT-LP em nosso modelo, porém, deverão ser futuramente analisados experimentalmente.

A administração subcutânea de um fármaco pode resultar em uma liberação sustentada. Titulaer e colaboradores (1990) observaram que o inóculo de cloroquina lipossomal pela via subcutânea teve uma ação de depósito, sendo liberada lentamente. Apesar de não ter sido realizado um estudo de concentração tecidual do fármaco, a eficácia da SERT-LP em nosso estudo poderia ser atribuída também a um possível efeito de depósito, permitindo uma liberação sustentada. Futuros estudos farmacocinéticos, incluindo biodisponibilidade, poderão servir de suporte para uma melhor compreensão destes resultados.

O presente estudo demonstrou que a sertralina é um potente fármaco anti-*Leishmania infantum in vitro*. Pela primeira vez na literatura, foi

encapsulado em lipossomos para o tratamento experimental da LV. Após ensaios em modelo murino, o estudo demonstrou que a sertralina lipossomal em altas doses, pode modular a resposta imunológica do hospedeiro, favorecendo o curso progressivo da doença. Porém, quando administrado na forma lipossomal em baixas doses, o fármaco lipossomal demonstrou capacidade de reduzir a carga parasitária, sendo direcionada ao fígado. Futuros estudos farmacocinéticos poderão contribuir na compreensão da ação desta nova formulação na LV.

6. Conclusões

1. A sertralina apresentou potente atividade contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum in vitro*, demonstrando seletividade.
2. A combinação terapêutica *in vitro* da SERT e MIL demonstrou uma associação aditiva ou indiferente, tanto em promastigotas quanto amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*.
3. O perfil farmacocinético oral da SERT em modelo murino demonstrou uma meia vida plasmática de 8 horas, porém, resultando em baixas concentrações plasmáticas, explicando sua falha terapêutica no modelo experimental *in vivo*.
4. A formulação lipossomal de sertralina (SERT-LP) apresentou-se como vesículas nanométricas com carga negativa.
5. A SERT-LP foi efetiva em modelo murino em baixas doses, porém, o perfil histopatológico dos órgãos infectados após o tratamento, demonstrou a persistência das lesões logo após o último dia de administração do fármaco. Este perfil histopatológico foi corroborado pelo aumento da quimiocina MCP-1, responsável pela quimiotaxia e formação de granuloma e hiperplasia linfóide observadas no fígado e baço, respectivamente.
6. Na dose terapêutica de 1 mg/kg, a SERT-LP reduziu a carga parasitária, resultando na diminuição da citocina IL-6, relacionada com a exacerbação da doença.
7. SERT-LP quando administrada na dose de 15 mg/kg induziu um aumento em 5 vezes dos níveis de IL-6, que foi relacionada ao aumento da carga parasitária observado.

8. A SERT-LP atingiu órgãos-alvo como fígado e baço de camundongos infectados com *Leishmania infantum*, explicando sua eficácia no modelo experimental.

7. Bibliografia

Abuaku BK, Mensah BA, Ofori MF, Myers-Hansen J, Derkyi-Kwarteng AN, Essilfie F, Dokurugu M, Amoakoh E, Koram KA, Ghansah A. Efficacy of Artesunate/Amodiaquine in the Treatment of Uncomplicated Malaria among Children in Ghana. *Am J Trop Med Hyg.* 2017. 97(3):690-695.

Akbari M, Oryan A, Hatam G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Trop.* 2017 Aug;172:86-90.

Aksoy Gökmen A, Öncel K, Özdemir OA, Pektaş B, Çavuş İ, Güngör S, Uzun B, Kaya S, Karaca Ş, Yula E, Demirci M, Özbilgin A. An alternative biphasic nutrient medium for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Mikrobiyol Bul.* 2015. 49(2):266-71.

Alderman J, Wolkow R, Chung M, Johnston HF. Sertraline treatment of children and adolescents with obsessive-compulsive disorder or depression: pharmacokinetics, tolerability, and efficacy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1998.37(4):386-94.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57:1-88. Review

Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2006;61:223-74. Review.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5):e35671.

Alving CR, Steck EA, Chapman WL Jr, Waits VB, Hendricks LD, Swartz GM Jr, Hanson WL. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Jun;75(6):2959-63

Allen TM, Hansen CB, Guo LS. 1993. Subcutaneous administration of liposomes: a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochim Biophys Acta* 25:9 –16

Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014 Mar 24;4(2):95-111.

Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol*. 2006 Jun;119(3):339-45.

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Aug;3(8):673-83.

Babuadze G, Alvar J, Argaw D, de Koning HP, Iosava M, Kekelidze M, Tsertsvadze N, Tsereteli D, Chakhunashvili G, Mamatsashvili T, Beria N, Kalandadze I, Ejov M, Imnadze P. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Georgia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Mar 6;8(3):e2725.

Barral-Neto M, Badaro R, Barral A, Almeida RP, Santos SB, Badaro F, Pedral-Sampaio D, Carvalho EM, Falcoff E, Falcoff R. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 1991, vol.163, pp. 853-857.

Batista CM, Carvalho CMB, Magalhães NSS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm*. 2007, vol.43, n.2, pp.167-179. ISSN 1516-9332.

Buffet PA, Sulahian A, Garin YJ, Nassar N, Derouin F. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Sep;39(9):2167-8.

Bush JT, Wasunna M, Alves F, Alvar J, Olliaro PL, Otieno M, Sibley CH, Strub Wourgaft N, Guerin PJ. Systematic review of clinical trials assessing the therapeutic efficacy of visceral leishmaniasis treatments: A first step to assess the feasibility of establishing an individual patient data sharing platform. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Sep 5;11(9): e0005781

Cai Y, Wang J, Liu X, Wang R, Xia L. A Review of the Combination Therapy of Low Frequency Ultrasound with Antibiotics. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2317846. doi: 10.1155/2017/2317846. Epub 2017 Oct 16

Campos-Ponce M, Ponce C, Ponce E, Maingon RD. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Exp Parasitol.* 2005 Apr;109(4):209-19.

Cassaday HJ, Thur KE. Intraperitoneal sertraline and fluvoxamine increase contextual fear conditioning but are without effect on overshadowing between cues. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015 Feb;129:111-5.

Charlton RL, Rossi-Bergmann B, Denny PW, Steel PG. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology.* 2017 Aug 14:1-18.

Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the

treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Feb;84(2):255-60.

Costa-Silva TA, Galisteo AJ Jr, Lindoso JA, Barbosa LR, Tempone AG. Nanoliposomal Buparvaquone Immunomodulates *Leishmania infantum*-Infected Macrophages and Is Highly Effective in a Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Mar 24;61(4).

Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *Eur J Immunol.* 1999 Jan;29(1):203-14.

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol.* 1987 Aug 15;36(16):2633-6.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003 Nov;19(11):502-8.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Jun;29(6):313-26.

Dey R, Majumder N, Bhattacharyya Majumdar S, Bhattacharjee S, Banerjee S, Roy S, Majumdar S. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. *Scand J Immunol.* 2007 Dec;66(6):671-83.

Dhanikula AB, Singh DR, Panchagnula R. 2005. *In vivo* pharmacokinetic and tissue distribution studies in mice of alternative formulations for local and

systemic delivery of Paclitaxel: gel, film, prodrug, liposomes, and micelles. *Curr Drug Deliv* 2:35– 44.

Dinesh N, Kaur PK, Swamy KK, Singh S. Mianserin, an antidepressant kills *Leishmania donovani* by depleting ergosterol levels. *Exp Parasitol*. 2014 Sep;144:84-90.

Dorlo TP, van Thiel PP, Huitema AD, Keizer RJ, de Vries HJ, Beijnen JH, de Vries PJ. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Aug;52(8):2855-60.

Drugbank. Sertraline. Acesso em 10/09/2017 <<https://www.Drugbank.ca/Drugs/Db01104>>

Eloy JO, Petrilli R, Trevizan LNF, Chorilli M. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Nov 1;159:454-467.

Evans AT, Croft SL. Antileishmanial actions of tricyclic neuroleptics appear to lack structural specificity. *Biochem Pharmacol*. 1994 Aug 3;48(3):613-6.

Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jul 10;8(7)

Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Nov;48(11):4097-102.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. bras. epidemiol*. 2004, vol.7, n.3, pp.338-349.

Guerra JM, Fernandes NCCA, Kimura LM, Shirata NK, Magno JA, Abrantes MF, Fernandes KR, Silva MMR, Barbosa JER, Taniguchi HH, Hiramoto RM, Nonogaki S, Tolezano JE. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania ssp.* em amostras de tecidos caninos. Revista Do Instituto Adolfo Lutz. Vol. 75. 2016.

Hailu T, Yimer M, Mulu W, Abera B. Challenges in visceral leishmaniasis control and elimination in the developing countries: A review. J Vector Borne Dis. 2016 Jul-Sep;53(3):193-8

Hendrickx S, Van den Kerkhof M, Mabile D, Cos P, Delputte P, Maes L, Caljon G. Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*. PLoS Negl Trop Dis. 2017 May 15;11(5):e0005620.

Hendrickx S, Mondelaers A, Eberhardt E, Delputte P, Cos P, Maes L. In Vivo Selection of Paromomycin and Miltefosine Resistance in *Leishmania donovani* and *L. infantum* in a Syrian Hamster Model. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Aug;59(8):4714-8.

Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg. 1992 Mar;46(3):296-306.

Huang H, Nguyen T, Ibrahim S, Shantharam S, Yue Z, Chen JY. DMAP: a connectivity map database to enable identification of novel drug repositioning candidates. BMC Bioinformatics. 2015;16 Suppl 13:S4.

Hussain A, Singh S, Sharma D, Webster TJ, Shafaat K, Faruk A. Elastic liposomes as novel carriers: recent advances in drug delivery. Int J Nanomedicine. 2017 Jul 17;12:5087-5108.

Laurenti, MD. Patologia e patogenia das leishmanioses [tese de livre-docente]. São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2010.

Laverman P, Boerman OC, Oyen WJ, Dams ET, Storm G, Corstens FH. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999 Apr 5;37(1-3):225-235.

Lindoso JA, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CH. Leishmaniasis-HIV coinfection:current challenges. *HIV AIDS (Auckl).* 2016 Oct 7;8:147-156.

Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da região metropolitana de belo horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001, vol.34, n.3, pp.249-254.

Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Dec 21;4(12).

Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica.* 2008 Dec;24(12):2941-7.

MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. *Leishmaniose visceral no Brasil.* Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, Brasil, v. 50, n. 5, p. 341-352, oct. 2013. ISSN 1678-4456.

Maurer M, Dondji B, von Stebut E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2009 Aug;198(3):137-46.

Moghimi SM, Patel HM. Altered tissue-specific opsonic activities and opsonic recognition of liposomes in tumour-bearing rats. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Nov 13;1285(1):56-64.

Molaie S, Mohebbali M, Abai MR, Molaie A, Akhondi B, Asl EM. Alteration of Direct Agglutination Test (DAT) results in Iranian Kala-Azar patients: a case series. *J Parasit Dis*. 2017 Jun;41(2):446-449.

Mukherjee S, Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Naskar K, Sundar S, Dujardin JC, Das AK, Roy S. Imipramine is an orally active drug against both antimony sensitive and resistant *Leishmania donovani* clinical isolates in experimental infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1987.

Muller PY, Milton MN. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Oct;11(10):751-61.

Murdoch D, McTavish D. Sertraline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in depression and obsessive-compulsive disorder. *Drugs*. 1992 Oct;44(4):604-24.

Murray HW. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun*. 2008 Sep;76(9):4088-91.

Nagle AS, Khare S, Kumar AB, Supek F, Buchynskyy A, Mathison CJ, Chennamaneni NK, Pendem N, Buckner FS, Gelb MH, Molteni V. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. *Chem Rev*. 2014 Nov 26;114(22):11305-47.

New Rrc. *Liposomes: a practical approach*. Oxford: Oxford University. 1990.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Jul;52(1):1.

Olliaro PL. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2010 Dec;23(6):595-602.

Onaolapo OJ, Paul TB, Onaolapo AY. Comparative effects of sertraline, haloperidol or olanzapine treatments on ketamine-induced changes in mouse behaviours. *Metab Brain Dis.* 2017 Oct;32(5):1475-1489.

Pai A, Weinberger LS. Fate-Regulating Circuits in Viruses: From Discovery to New Therapy Targets. *Annu Rev Virol.* 2017 Sep 29;4(1):469-490.

Palit P, Ali N. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 2008 May;61(5):1120-4.

Pastorino AC, Jacob CM, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. *J Pediatr (Rio J).* 2002 Mar-Apr;78(2):120-7.

Pelissari DM, Cechinel MP, Sousa-Gomes ML, Júnior FEFL. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 20 (1): 107-110.

Pereira-Figueiredo I, Castellano O, Riobos AS, Ferreira-Dias G, López DE, Sancho C. Long-Term Sertraline Intake Reverses the Behavioral Changes Induced by Prenatal Stress in Rats in a Sex-Dependent Way. *Front Behav Neurosci.* 2017 May 29;11:99.

Pimentel LF, Junior ATJ, Mosqueira VCF, Santos-Magalhães NS. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* [online]. 2007, vol.43, n.4, pp.503-514

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tornazela DM, Jesús MN, Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova.* Vol. 26, N. 4. 2003.

Reimão JQ, Tempone AG. Investigation into in vitro anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Dec;106(8):1032-8.

Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chioccola VL, Tempone AG. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *Exp Parasitol.* 2012 Mar;130(3):195-9.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008 Mar;22(3):659-61. Epub 2007 Oct 17

Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors.* 2016 Mar 1;9:118.

Romero GAS, Costa DL, Costa CHN, de Almeida RP, de Melo EV, de Carvalho SFG, Rabello A, de Carvalho AL, Sousa AQ, Leite RD, Lima SS, Amaral TA, Alves FP, Rode J; Collaborative LVBrasil Group. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Jun 29;11(6):e0005706.

Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Koller D, Talegón M, Ovejero-Benito MC, López-Rodríguez R, Cabaleiro T, Abad-Santos F. Effect of

Polymorphisms on the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Safety of Sertraline in Healthy Volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017 Nov 14.

Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis*. 2016 Mar;53(1):8-16.

Santos AM et al. Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente. *Soc. Bras. Med. Trop*. 2008, vol.41, n.5, pp.444-448.

Santuzzi CH, Futuro Neto HA, Pires JG, Gonçalves WL, Tiradentes RV, Gouvea SA, Abreu GR. Sertraline inhibits formalin-induced nociception and cardiovascular responses. *Braz J Med Biol Res*. 2012 Jan;45(1):43-8

Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis*. 2013 Aug;17(8): e572-6.

Sazgarnia A, Taheri AR, Soudmand S, Parizi AJ, Rajabi O, Darbandi MS. Antiparasitic effects of gold nanoparticles with microwave radiation on promastigots and amastigotes of *Leishmania major*. *Int J Hyperthermia*. 2013;29(1):79-86.

Sengupta S, Tyagi P, Velpandian T, Gupta YK, Gupta SK. Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies. *Pharmacol Res*. 2000 Nov;42(5):459-64

Scheerans C, Heinig R, Mueck W. Proposal for defining the relevance of drug accumulation derived from single dose study data for modified release dosage forms. *Biopharm Drug Dispos*. 2015 Mar;36(2):93-103.

Shelton RC. The role of sertraline in the management of depression. Clin Ther. 1994 Sep-Oct;16(5):768-82.

Singh S, Dinesh N, Kaur PK, Shamiulla B. Ketanserin, an antidepressant, exerts its antileishmanial action via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) enzyme of *Leishmania donovani*. Parasitol Res. 2014. Jun;113(6):2161-8

Singh S, Sarma S, Katiyar SP, Das M, Bhardwaj R, Sundar D, Dubey VK. Probing the molecular mechanism of hypericin-induced parasite death provides insight into the role of spermidine beyond redox metabolism in *Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Jan;59(1):15-24.

Smith DA, Allerton C, Kalgutkar AS, van de Waterbeemd H, Walker DK. Pharmacokinetics. In: pharmacokinetics and metabolism in drug design. Third Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2012.

Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. Immunol Cell Biol. 2007 Feb-Mar;85(2):138-47.

Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. Journal of Protozoology. Vol. 5. 1958.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop Med Int Health. 2001 Nov;6(11):849-54.

Sundar S, Singh A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. Ther Adv Infect Dis. 2016 Jun;3(3-4):98-109.

Sundar S. Treatment of visceral leishmaniasis. Med Microbiol Immunol. 2001 Nov;190(1-2):89-92.

Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res.* 2006 Mar;123(3):345-52.

Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag.* 2007 Oct;3(5):733-40.

Tallarida RJ. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006; 319.

Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med.* 2011 Apr;77(6):572-85.

Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, de Andrade HF Jr. Targeting *Leishmania* (L.) *chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jul;54(1):60-8.

Tempone AG, da Silva AC, Brandt CA, Martinez FS, Borborema SE, da Silveira MA, de Andrade HF Jr. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Mar;49(3):1076-80.

Tempone AG, Mortara RA, de Andrade HF Jr, Reimão JQ. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Aug;36(2):159-63.

Tonin AA, Calado AM, Bottari NB, Dalenogare D, Thomé GR, Duarte T, Duarte MM, Morsch VM, Schetinger MR, Alves LC, Tinucci-Costa M, Da Silva AS. Novel markers of inflammatory response and hepatic dysfunction in canine leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016 Feb;44:61-4.

Torchilin V, Weissing V. Liposomes: A practical approach. Oup Uk. Reino Unido. 2003.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. F1000Res. 2017 May 26;6:750.

Tuntland T, Ethell B, Kosaka T, Blasco F, Zang RX, Jain M, Gould T, Hoffmaster K. Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at Novartis Institute of Biomedical Research. Front Pharmacol. 2014 Jul 28;5:174.

Uliana SR, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. Parasitology. 2017 Jan 20:1-17.

Vacchina P, Norris-Mullins B, Carlson ES, Morales MA. A mitochondrial HSP70 (HSPA9B) is linked to miltefosine resistance and stress response in *Leishmania donovani*. Parasit Vectors. 2016 Dec 1;9(1):621.

Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. Curr Pharm Des. 2002;8(4):297-318.

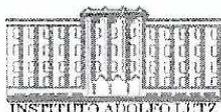
Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. Pharm Acta Helv. 1995 Jul;70(2):95-111.

Who – World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of a Meeting. March 2010. Geneva. 2010.

Yardley V, Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. Journal of Antimicrobial Agents. Vol. 4. 2000.

Zani IA, Stephen SL, Mughal NA, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft SB, Ponnambalam S. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells*. 2015 May 22;4(2):178-201.

Zilberstein D, Liveanu V, Gepstein A. Tricyclic drugs reduce proton motive force in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Biochemicalpharmacology*. Vol.39, n. 5. 1990.



ANEXO E

São Paulo, 23 de setembro de 2016.

Protocolo 04/2016
Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)

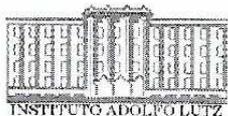
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Estudo pré-clínico racional de novos candidatos a fármacos em protozooses negligenciadas utilizando abordagens farmacocinéticas**”, sob a responsabilidade de **André Gustavo Tempone Cardoso**, Pesquisador Científico do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação (CONCEA). Este Projeto foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) na **60a** reunião realizada em **13/09/2016**.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários, os quais permitirão a elaboração de relatórios anuais por esta CEUA-IAL, que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Vigência do Projeto	13/09/2016 a 01/06/2020
---------------------	-------------------------

Espécie	Camundongos heterogênicos
Linhagem	Swiss
N° de animais	60
Idade	19 a 21 semanas
Peso	18 gramas
Sexo	Machos
Origem	Biotério IAL

Espécie	Camundongos isogênicos
Linhagem	Balb/c
N° de animais	129 machos e 48 fêmeas
Idade	19 a 21 semanas
Peso	18 gramas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério IAL



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



Espécie	Hamster
Linhagem	Sírio dourado
Nº de animais	90
Idade	20-25 semanas
Peso	30 a 40 gramas
Sexo	Machos
Origem	Biotério IAL

Atenciosamente,

Dra. Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IAL)
Instituto Adolfo Lutz

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar – Salas 1102
Pacaembu - São Paulo – SP – CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br