

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

Aretha Molina Sesana

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA E DESOXICOLATO DE ANFOTERICINA B E DA
ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE UMA NOVA FORMULAÇÃO DE
ANFOTERICINA B NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM
Leishmania (Leishmania) chagasi.**

**Vitória
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Aretha Molina Sesana

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA E DESOXICOLATO DE ANFOTERICINA B E DA
ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE UMA NOVA FORMULAÇÃO DE
ANFOTERICINA B NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM
Leishmania (Leishmania) chagasi.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Grau de mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenice Moreira Lemos
Co-orientador: Prof. Dr. Reynaldo Dietze

Vitória
2009



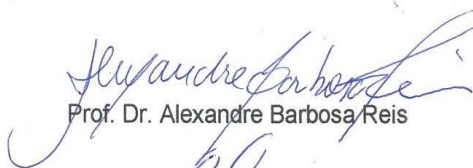
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

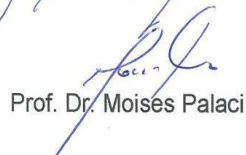
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

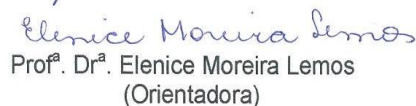
A mestranda ARETHA MOLINA SESANA, apresentou dissertação intitulada: "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA E DESOXICOLATE DE ANFOTERICINA B E DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE UMA NOVA FORMULAÇÃO DE ANFOTERICINA B NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Leishmania (Leishmania) Chagasi*" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar a farmacêutica ARETHA MOLINA SESANA, a obter o Grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – PATOLOGIA GERAL DAS DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 30 de abril de 2009


Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis


Prof. Dr. Moisés Palaci


Prof.^a Dr.^a Elenice Moreira Lemos
(Orientadora)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S493a Sesana, Aretha Molina.
Avaliação do efeito da associação do antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B e da atividade anti-*Leishmania* de uma nova formulação de anfotericina B na infecção experimental com *Leishmania (Leishmania) chagasi* / Aretha Molina Sesana. – 2009.
83 f. : il.

Orientadora: Elenice Moreira Lemos.

Co-Orientador: Reynaldo Dietze.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmaniose - Tratamento. 3. Anfotericina B. I. Lemos, Elenice Moreira. II. Dietze, Reynaldo. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

**Ao meu Pai e à minha Mãe, por todo o
amor e confiança.**

***“Quando não houver caminho, mesmo sem amor, sem direção;
a sós ninguém está sozinho, é caminhando que se faz o caminho.
Quando não houver desejo, quando não restar nem mesmo dor,
ainda há de haver desejo, em cada um de nós, aonde Deus colocou”***

Sérgio Brito

AGRADECIMENTOS

“A felicidade aparece para aqueles que choram, para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas” Clarice Lispector

Agradeço a Deus pela benção da vida. Por toda a alegria que me engrandece e por toda a dificuldade que me fortalece. Pelas pessoas que enviaste para o meu aprendizado e para que eu pudesse ensiná-las também com o que tenho a oferecer. Obrigada pelo dom de reconheceste nas mais singelas coisas.

A minha família: meu Pai e minha Mãe, Silvestre e Maria da Penha, minha Irmã Juliana e meu Irmão Silmar. Obrigada acima de tudo pelo amor incondicional, pelos maiores ensinamentos já realizados fundamentados numa estrutura familiar sem igual. Obrigada pela dedicação ao meu crescimento e pelas oportunidades que me foram reservadas. Guardo em mim um pedaço de cada um.

A minha orientadora Prof. Dra. Elenice Moreira Lemos, pelo incentivo incessante, pelos ensinamentos cedidos e por toda a confiança em mim depositada. Obrigada por contribuir de forma essencial para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Reynaldo Dietze, coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas, pela dedicação à manutenção deste centro de pesquisa. Obrigada pelo incentivo e confiança.

Ao Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis, pela disposição tanto em me receber em seu laboratório como por aceitado o nosso convite, obrigada pela contribuição que me foi dada.

Ao Prof. Dr. Moisés Palaci, pela presença constante em minha formação, e pela contribuição na conclusão deste trabalho. Agradeço também por ter aceitado o nosso convite para participar da banca de defesa.

A Prof. Solange Alves Vinhas pela dedicação aos nossos projetos, pela paciência nos ensinamentos iniciais, enfim, pela contribuição fundamental não só para o andamento deste trabalho como para a manutenção do centro de pesquisa. A você toda a minha admiração e respeito pelo seu trabalho.

A Prof. Dra. Simone Resende por tamanha disposição em contribuir para a conclusão deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos fundamentais que me foram cedidos.

Ao Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, toda a minha admiração, não só pela capacidade inigualável de ensinar como pelo amor pelo saber. Obrigada por poder contar com a sua sabedoria sempre.

Ao Prof. Rodrigo Ribeiro Rodrigues pela contribuição em toda a minha formação e pela amizade constante.

Aos funcionários do IDAF, pela eterna dedicação em contribuir para o nosso trabalho. Obrigada pela disposição.

Ao Carlos Gustavo Vieira de Moraes, meu companheiro de trabalho e amigo, obrigada por ter me ensinado tudo aquilo que lhe cabia e um pouco mais pela nossa amizade.

Aos meus amigos do laboratório de leishmanioses, Renata, Laura, Priscila, Cinthia, Marco André, Mauro, Lucas, Marcela e Bruna, pela convivência que nos rendeu muitos ensinamentos; agradeço em especial aqueles que dividiram seu tempo e seu trabalho comigo em troca apenas de aprendizado e amizade. Obrigada.

A minha amiga do mestrado Juliana, que se tornou ao longo deste tempo de convivência uma grande amiga pessoal. Obrigada Ju, pelo presente que é a sua amizade, sua presença e suas palavras sempre foram um incentivo para a minha vida.

Aos meus queridos amigos do mestrado e do NDI: Renata, Juliana, Lucília, Thiago, Fabíola, Maria, Lúcia, Carlinha e Valéria, pela convivência e paciência, obrigada além de tudo pela amizade e compreensão.

Aos meus amigos pessoais: Ana Carolina, Joyce, Michele, Jamile, Fernando, Silvia, Deise e Ana Paula, pela compreensão durante a minha ausência. Obrigada por vocês existirem na minha vida.

A todos os funcionários do NDI, por proporcionarem sempre uma convivência tão agradável.

A Fátima Aparecida Pereira, secretária da pós-graduação, por todos esses anos de dedicação ao melhor andamento do mestrado e pela sua amizade.

Ao meu querido companheiro Rafael Francês Guimarães, por ter feito parte de todos os momentos mais fortes da minha vida, entre altos e baixos o amor sempre prevalece. Obrigada pela compreensão, pelo incentivo e pelo seu amor.

RESUMO

Apesar da descoberta da ação leishmanicida dos antimoniais pentavalentes ter sido o fato de maior impacto na epidemiologia da leishmaniose visceral (LV), seus efeitos tóxicos e o longo tempo de tratamento ainda limitam seu uso. Como droga de segunda escolha é utilizado o desoxicolato de anfotericina B, um antibiótico com alta atividade anti-*Leishmania*, sendo seu uso também restrito em virtude de sua alta toxicidade. Portanto, o grande desafio ao longo dos anos tem sido o desenvolvimento de novos medicamentos ou novas formulações de drogas já existentes, bem como a utilização de terapia combinada. Neste sentido, nos propusemos a avaliar o efeito da associação do antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B (DAMB) e da atividade de uma nova formulação de anfotericina B (CAMB) na infecção experimental com *L. (L.) chagasi*. Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. (L.) chagasi* tratados com diferentes concentrações das drogas. A atividade das drogas foi determinada pela porcentagem de macrófagos infectados tratados em relação ao controle não tratado. Para avaliar o efeito da combinação foi utilizado o método da Razão Fixada Modificado e para classificar as interações foram utilizados como *cutoffs* a média dos Σ FICs de 0,5 e 4. Os resultados demonstraram que a associação entre o antimoniato de meglumina e DAMB apresentou um efeito aditivo, com Σ FIC variando entre 0,65 e 1,02 para a CI_{50} . Na análise *in vitro* da atividade de CAMB utilizamos como controle o DAMB e nossos resultados demonstraram uma atividade semelhante entre as duas drogas, com CI_{50} de 0,017 e 0,021 μ g/mL para CAMB e DAMB respectivamente, no entanto apresentou uma menor citotoxicidade em relação a DAMB. Nos experimentos de infecção *in vivo* a CAMB não apresentou atividade quando administrada por via oral utilizando as doses de 1 e 5 mg/kg/dia durante 15 dias; enquanto que DAMB administrado por via intraperitoneal mostrou-se altamente eficaz, sugerindo que o uso de doses mais elevadas e vias alternativas de administração da CAMB ainda devem ser avaliadas para confirmar esses achados.

ABSTRACT

Despite the discovery of action antileishmanial of Pentavalent antimonials have been the fact that a greater impact on the epidemiology of visceral leishmaniasis, toxic effects and long-term treatment still limit their use. As the second drug of choice is the use of deoxycholate amphotericin B, an antibiotic with high anti-Leishmania activity, and its use is also restricted because of its high toxicity. The major challenge is the development of new drugs, or new formulations of standard drugs, and therapeutic regimens like drugs combinations. Thus, we evaluate the effect of association between meglumine antimoniate and anphotericin B desoxycholate and antileishmanial activity of a new formulation (CAMB) of amphotericin B in the experimental infection with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Peritoneal macrophages from mice infected with *L. chagasi* treated with different drugs. Drug activity was determined from the percentage of infected cells in drug-treated cultures in relation to nontreated cultures. *In vitro* drug interactions were assessed using a modified fixed-ratio method and to classify the interactions, means Σ FICs of 0.5 and 4 were used as cutoffs. The interaction of meglumine antimoniate and DAMB was additive with mean Σ FICs of 0,65 to 1.02 at the IC₅₀ level. To analysis *in vitro* activity of CAMB was used as control DAMB, and the results showed a similar activity between the two drugs, with IC₅₀ of 0,017 and 0,021 μ g/mL for CAMB and DAMB respectively, however showed a lower cytotoxicity compared to DAMB. However, *in vivo* infection mice, CAMB showed no efficacy when administered orally at doses of 1 and 5mg/kg/day for 15 consecutive days, while DAMB injected intraperitoneally was highly effective, suggesting that the use of higher doses and alternative routes of administration of CAMB yet to be evaluated to confirm these findings.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMB	Anfotericina B
B.O.D.	do inglês “Biological Oxygen Demand”
CAMB	Anfotericina B cocleada
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CI ₉₀	Concentração inibitória de 90%
DAMB	Desoxicolato de anfotericina B
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
ELISA	do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
et al.	e colaboradores
FIC	Fração da Concentração Inibitória
g	gramas
GLU	Glucantime [®] – antimoniato de meglumina
IDAF	Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo
Intervalo QTc	diz-se a medida de intervalos de tempo que ocorrem durante os impulsos elétricos que estimulam a contração do coração
Kg	quilograma
L-AmB	Anfotericina B lipossomal
LIT	do inglês “liver infusion tryptose”
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes

LV	Leishmaniose visceral
ml	mililitros
MLV	Vesículas Multilamelares
MTT	-3,(-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo
nm	nanômetros
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
OMS	Organização Mundial de Saúde
Onda T	em eletrocardiografia, diz-se a onda que mede a recuperação ventricular
PBS	do inglês “Phosphate buffered saline”
rpm	rotações por minuto
RPMI	do inglês “Royal Park Memorial Institute”
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SFB	Soro Fetal Bovino
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas
WHO	do inglês “World Health Organization” ou Organização Mundial de Saúde
X g	força centrífuga
°C	grau Celsius
μl	microlitros
Σ	somatório

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Inverso da diluição do macerado do fragmento de fígado	43
TABELA 2	Atividade <i>in vitro</i> do antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B contra amastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	48
TABELA 3	Concentrações do antimoniato de meglumina e do desoxicolato de anfotericina B utilizados nos ensaios de associação de drogas	49
TABELA 4	Média do Σ FICs da associação entre o antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B em ensaios <i>in vitro</i> de infecção com <i>L. (L.) chagasi</i>	50
TABELA 5	Atividade <i>in vitro</i> da anfotericina B cocleada contra amastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	53
TABELA 6	Atividade da anfotericina B cocleada em ensaios <i>in vivo</i> de infecção de camundongos com <i>L. (L.) chagasi</i>	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo evolutivo das espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de LV	21
FIGURA 2	Estrutura do nanocochleate contendo a anfotericina B	30
FIGURA 3	Mecanismos de fusão dos cochleates e distribuição da anfotericina B dentro das células alvo	31
FIGURA 4	(A) Distribuição dos macrófagos nas câmaras de cultura quando infectados com a razão de 7:1 parasitos / macrófago (B) Distribuição dos macrófagos nas câmaras de cultura quando infectados com a razão de 10:1 parasitos / macrófago.	47
FIGURA 5	Porcentagem de macrófagos vivos quando tratados com diferentes concentrações de CAMB e DAMB nos ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i>	51
FIGURA 6	Análise das concentrações das drogas a serem testadas nos ensaios de atividade anti- <i>Leishmania</i> .	52
FIGURA 7	Cultura de macrófagos murinos infectados com <i>L. chagasi</i> tratados com diferentes concentrações de CAMB	54
FIGURA 8	Comparação da atividade do desoxicolato de anfotericina B produzido por diferentes fabricantes em ensaios de atividade anti- <i>Leishmania in vitro</i>	55
FIGURA 9	Curva de infecção no fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> (cepa PP75)	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVO	33
2.1	Objetivos Geral.....	34
2.2	Objetivos Específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Obtenção e cultivo das formas promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	35
3.2	Drogas.....	36
3.3	Ensaio <i>in vitro</i>	36
3.3.1	Preparo das formas promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> para os ensaios <i>in vitro</i> de infecção de macrófagos murinos	36
3.3.2	Ensaio <i>in vitro</i> de atividade de drogas anti- <i>Leishmania</i>	37
3.3.3	Ensaio <i>in vitro</i> de associação de drogas com atividade anti- <i>Leishmania</i>	38
3.3.4	Ensaio de citotoxicidade de drogas	39
3.4	Ensaio <i>in vivo</i>	40
3.4.1	Preparo das formas promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> para os ensaios de infecção <i>in vivo</i>	40
3.4.2	Curva de infecção de camundongos com <i>L. (L.) chagasi</i>	40
3.4.3	Quantificação dos parasitos no fígado dos camundongos infectados com <i>L. (L.) chagasi</i>	41
3.4.4	Ensaio <i>in vivo</i> de atividade de drogas anti- <i>Leishmania</i>	42
3.5	Aspectos Éticos.....	44
4	RESULTADOS	45

4.1	Padronização dos ensaios <i>in vitro</i> de infecção de macrófagos com <i>L. (L.) chagasi</i>	46
4.2	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito da associação de antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B	48
4.3	Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> da anfotericina B cocleada	50
4.3.1	Análise da citotoxicidade da anfotericina cocleada	50
4.3.2	Atividade <i>in vitro</i> da anfotericina B cocleada em ensaios de infecção de macrófagos com <i>L. (L.) chagasi</i>	51
4.3.3	Comparação da atividade anti- <i>Leishmania</i> do desoxicolato de anfotericina B produzido por diferentes fabricantes	54
4.3.4	Padronização dos ensaios de infecção <i>in vivo</i>	55
4.3.4.1	Curva de infecção de camundongos com <i>L. (L.) chagasi</i>	55
4.3.4.2	Ensaio <i>in vivo</i> de atividade anti- <i>Leishmania</i>	56
5	DISCUSSÃO	58
5.1	Avaliação do efeito da associação do antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B na infecção experimental com <i>L. (L.) chagasi</i>	59
5.2	Avaliação da anfotericina B cocleada na infecção experimental com <i>L. (L.) chagasi</i>	62
6	CONCLUSÕES	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) foi primeiramente descrita na Grécia em 1835, quando era então chamada “ponos” ou “hapoplinakon”. No entanto, foi na Índia, em 1869, que recebeu o nome “kala-jwar” ou kala-azar, que significa pele negra, em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (KEAN et al., 1978). No ano de 1900, William Leishman ao realizar uma autópsia num soldado que foi a óbito na Índia, identificou no baço, a presença de um protozoário. O mesmo protozoário foi encontrado por Charles Donovan no ano de 1903 em outro paciente. No mesmo ano, Bruce e colaboradores descreveram o protozoário com o nome de *Piroplasma donovani* que, mais tardiamente passou a ser chamado *Leishmania donovani*, em homenagem a Willian Leishman e Charles Donovan. Em 1904, Leonard Roger foi o primeiro a conseguir cultivar o parasito, que se apresentava sob a forma flagelada. Em 1907, Patton descreveu as formas amastigotas em monócitos e as formas promastigotas no intestino de insetos que picavam pacientes com Kala-azar as quais se apresentavam tal como as formas flageladas vista nas culturas de Roger (FAUST et al., 1974).

A LV é uma doença sistêmica causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* complexo *donovani*. O complexo *donovani* inclui quatro espécies de parasitos: *Leishmania (Leishmania) donovani* Laveran & Mesnil, 1903, *Leishmania (L.) infantum*, Nicole, 1908, *Leishmania (L.) chagasi* Cunha & Chagas, 1937, *Leishmania (L.) archibaldi* Castellani & Chalmers, 1919. A *L. (L.) donovani* é endêmica no subcontinente Indiano, China, Sudão, Etiópia e Quênia; a espécie *L. (L.) infantum* distribui-se da região Mediterrânea ao Irã, China, Sudão e Etiópia; a espécie *L. (L.) archibaldi* tem sido encontrada apenas no continente Africano: Sudão e Etiópia; já a *L. (L.) chagasi* é encontrada, exclusivamente, nas Américas Central e do Sul (KUHLS et al., 2007).

A LV é endêmica em todos os continentes à exceção da Oceania, sendo responsável por aproximadamente meio milhão de casos novos e 59.000 óbitos a

cada ano (WHO, 2002). Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam sob o risco de adquirir a infecção. A LV é autóctone em 65 países, nos quais a maioria dos casos (90%) ocorre em áreas rurais e áreas suburbanas de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (SUNDAR, 2001a).

Nas Américas, a LV humana ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que 90% dos casos registrados ocorrem no Brasil, onde está distribuída em 19 das 27 unidades federativas, atingindo 4 das 5 regiões brasileiras. Sua maior incidência encontra-se na região nordeste, na qual concentram-se 65% dos casos. No Brasil registram-se, em média, cerca de 3.700 casos de LV por ano e o coeficiente de incidência é de 2,0 casos / 100.000 habitantes. A letalidade está em torno de 8%, o que corresponde a uma média de 230 óbitos por ano (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Brasil, 2007).

A infecção ocorre quando formas promastigotas infectantes são inoculadas no hospedeiro (homem ou cão) durante o repasto sanguíneo de fêmeas do inseto vetor. Neste momento, os parasitos são internalizados por células fagocitárias, predominantemente macrófagos. Nos macrófagos os parasitos perdem os flagelos, tornando-se arredondados ou ovóides e são então denominados amastigotas, formas que residem no interior dos fagolisossomos, onde sobrevivem e se multiplicam. Eventualmente, os macrófagos infectados se rompem e liberam as amastigotas, que são internalizadas por macrófagos vizinhos. Durante um novo repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania*, que são levadas ao intestino, onde se transformam em promastigotas e se multiplicam. Quando o inseto exerce novo hematofagismo, formas infectantes são inoculadas, reiniciando assim, o ciclo do hospedeiro vertebrado (Figura 1) (SACKS & KAMHAWI, 2001).

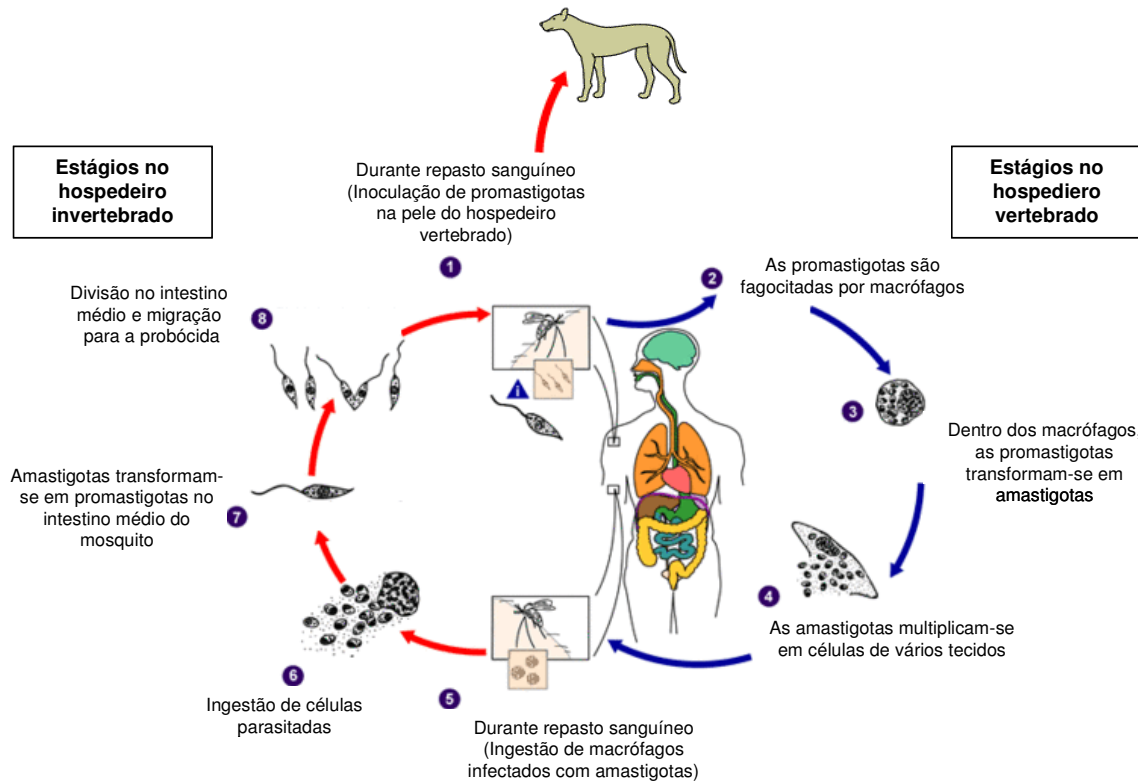


Figura 1 – Ciclo evolutivo das espécies de *Leishmania* causadoras de LV. Adaptado de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/leishmaniasis.htm>

O homem, após adquirir a infecção, pode exibir a forma clínica assintomática ou a forma oligossintomática (BADARÓ et al., 1986a; GAMA et al., 2004) que podem evoluir para cura clínica espontaneamente ou para a forma clássica da doença. A maioria dos seres humanos desenvolve a forma clínica assintomática com evolução para cura espontânea (BADARÓ et al., 1986; EVANS et al., 1992; GAMA et al., 2004). Na forma clássica da doença, as principais manifestações clínicas são a hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia (HO et al., 1982; EVANS et al., 1985; DE BEER et al., 1991), diarreia, epistaxis, icterícia, febre, pancitopenia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, tosse seca, taquicardia e hipotensão arterial (PEARSON et al., 1999).

O controle da LV está diretamente associado à redução dos casos humanos e caninos, e consiste basicamente no tratamento de todos os casos humanos, na eliminação dos reservatórios domésticos, o que resulta na quebra do elo de transmissão da antroponose, no combate do vetor e numa rigorosa vigilância epidemiológica (MAGALHÃES et al., 1980).

O tratamento quimioterápico em pacientes humanos propicia a cura clínica na maioria dos casos. Entretanto, por se tratar de uma doença fortemente atrelada à pobreza e que acomete principalmente os países subdesenvolvidos, a LV foi recentemente considerada a doença negligenciada de menor interesse ao longo das décadas quanto ao desenvolvimento de fármacos pela indústria farmacêutica, no que diz respeito à efetividade da cura, facilidade de tratamento e acesso à droga (YAMEY & TORRELE, 2002; MOREL, 2003).

Após 90 anos do seu uso pela primeira vez no tratamento da LV (DI-CHRISTINA & CARONIA, 1915), os compostos antimoniais pentavalentes – Sb^{5+} ainda são as drogas de escolha para o tratamento da doença (HERWALDT, 1999; MURRAY et al., 2005). Duas formas de Sb^{5+} são utilizadas para o tratamento da LV: o estibogluconato de sódio (Pentostam®, GlaxoSmithKline) e o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®, Aventis Pharma).

Apesar dos antimoniais consistirem na primeira linha de tratamento da LV desde a década de 40, pouco se sabe sobre o seu mecanismo de ação. A ação anti-parasitária dessas drogas devem-se à influência na bioenergética do parasita, pela inibição da glicólise, da β -oxidação dos ácidos graxos do parasita e da fosforilação do ADP (BERMAN et al., 1985; BERMAN et al., 1987). Wyllie e colaboradores, em 2004, também demonstraram que os antimoniais podem promover o efluxo de tióis, glutatona e tripanotona, com alteração no metabolismo de redução dos tióis, tornando o parasita mais sensível ao estresse oxidativo.

A partir de 1915, com a disseminação do seu uso no tratamento da LV, as doses recomendadas dos antimoniais, vêm aumentando progressivamente. Isto se deve

à resistência ou a não resposta terapêutica vista com frequência cada vez maior em países com Índia, Quênia e China (BRYCESON et al., 1985a). Os índices atuais de resistência primária ou não resposta terapêutica chegam a 65% em Bihar, na Índia (SUNDAR, 2001b). No Brasil, o fenômeno da não resposta terapêutica tem sido observado em menor escala (PASTORINO et al., 1988; BADARÓ et al., 1990) e ainda não existem estudos comprovando *in vitro* a resistência ou não resposta terapêutica observada algumas vezes *in vivo* (DIETZE et al., 1985). Entretanto, do ponto de vista prático, os relatos na literatura sobre o insucesso terapêutico da doença e a inexistência de estudos controlados sobre a dimensão exata do problema acabaram por elevar as doses recomendadas no tratamento da LV, em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde – OMS (WHO, 1990), e o Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 1996), passaram a recomendar para o tratamento da doença a dose de 20mg/Kg/dia de Sb⁵⁺, por via intramuscular ou intravenosa, num período de 20 a 40 dias consecutivos.

De todas as drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses, os antimoniais pentavalentes, devido ao seu uso extensivo, são aquelas cujos efeitos colaterais são mais conhecidos. Seus principais paraefeitos estão relacionados à toxicidade cardíaca, hepática, pancreática e renal, além de sua toxicidade sobre o sistema músculo-esquelético (GASSER et al., 1994; SUNDAR et al., 1998c; THAKUR et al., 1998; RIJAL et al., 2003). A cardiotoxicidade traduz-se principalmente por distúrbios da repolarização ventricular, que incluem alterações da onda T e aumento do intervalo QTc. Estas alterações estão presentes em 10 a 50% dos casos e são dose e tempo dependentes (CHULAY et al., 1985; THAKUR, 1986; KRISHNAN et al., 1987; FRANKE et al., 1990; NAVIN et al., 1992).

Os efeitos colaterais do aparelho gastrointestinal são os mais frequentes e incluem náuseas, anorexia e dor abdominal (FRANKE et al., 1990; SALDANHA et al., 1999). A toxicidade hepática ocorre em percentuais de até 50% dos pacientes tratados, bem como a nefrotoxicidade, que ocorre em decorrência da eliminação

renal da droga. Vale ressaltar, ainda, que a toxicidade decorrente dos antimoniais pentavalentes, tem cingido seu uso nos casos de gravidez (CORREIA, 1996).

Nos casos de indicação restrita, resistência ou falha terapêutica dos antimoniais pentavalentes, utiliza-se a anfotericina B (AMB) como droga de segunda escolha para o tratamento da LV. No Brasil, a dose da AMB recomendada pelo Ministério da Saúde para o tratamento da LV é de 1mg/kg/dia durante 14 dias.

A anfotericina B é a mais potente das drogas anti-*Leishmania* disponíveis, com efeito demonstrado tanto *in vitro* (BERMAN & WYLER, 1980) quanto *in vivo* (PRATA, 1963; MISHRA et al., 1991, 1992, 1994; GIRI, 1993a, 1993b; THAKUR et al., 1993a, 1993b, 1993c, 1994a, 1994b; JHA, 1995; CARVALHO, 2000). Em modelos animais (Hamsters), a anfotericina B foi 130 a 187 vezes mais potente que o Sb^{5+} , quando os animais eram tratados precocemente e, 43 a 139 vezes mais ativa quando o tratamento era feito na fase tardia da infecção. Em macacos infectados experimentalmente a droga foi 138 vezes mais ativa que os compostos antimoniais (BERMAN et al., 1986).

A anfotericina B pertence ao grupo dos antibióticos poliênicos macrolídeos produzida por diferentes espécies de *Streptomyces*. A molécula da anfotericina B contém uma rígida unidade heptâmera não-polar e uma região mais flexível de poliol que se funde ao anel de macrolactona. A presença desses grupos torna o antibiótico insolúvel em solução aquosa, e solúvel somente em metanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (BOLARD, 1986). As preparações comerciais utilizam o desoxicolato de sódio como agente dispersante para a formação de uma suspensão coloidal de ação parenteral.

A AMB liga-se à membrana plasmática da *Leishmania* formando poros aquosos, consistindo de oito moléculas de AMB ligadas hidrofobicamente aos esteróis presentes na membrana do patógeno (ergosterol). A formação desses poros hidrofílicos permite uma alteração na permeabilidade da membrana, promovendo a perda de metabólitos essenciais e lise celular (KOTLER-BRAJTBURG, 1979). É interessante ressaltar, que a AMB liga-se mais avidamente ao ergosterol

presente na membrana da *Leishmania*, que ao colesterol presente na membrana eucariótica, o que contribui para a seletividade da droga à célula do parasito (GRUDA et al., 1980; VERTUT-CROQUIN et al., 1983).

Os principais efeitos colaterais descritos com o uso da anfotericina B são bem conhecidos e incluem: febre, calafrio, cefaléia, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão. Estes paraefeitos são geralmente observados durante a infusão da droga (GIGLIOTTI et al., 1987; CHIA & POLLACK, 1989). Devido à toxicidade às células do endotélio vascular, a flebite também é um efeito colateral comum (GALLIS et al., 1990). A anemia pode chegar a 75% dos pacientes tratados com AMB, em virtude do dano direto sobre as hemácias. A nefrotoxicidade é resultante da ação direta da AMB sobre os túbulos renais, assim como a indução de uma vasoconstricção renal, o que resulta na diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BALEY et al., 1990). Também foi observado que grande parte da nefrotoxicidade é decorrente do veículo utilizado como dispersante, o desoxicolato de sódio (ZAGER et al., 1992). Hipocalcemia, hipomagnesemia, neurotoxicidade, acidose tubular renal e cardiotoxicidade também podem ocorrer (McCURDY et al., 1968; BURGESS & BIRCHALL, 1972; HOEPRICH, 1992; THAKUR, 1993b). Parada cardíaca já foi descrita em casos de infusão rápida da droga (DRUTZ, 1992; THAKUR, 1995a). A infusão rápida de anfotericina B em pacientes com a função renal comprometida pode levar a hipercalemia e fibrilação ventricular (CRAVEN & GREMILLION, 1985).

O grande desafio ao longo dos anos ainda tem sido o desenvolvimento de drogas mais eficazes, menos tóxicas, com uma terapia de curta duração e baixo custo. Muitas tentativas já foram feitas, algumas com pouco ou nenhum êxito. Talvez uma das mais promissoras venha ser a terapia combinada que desde a década de 80 vem sendo investigada.

A associação de drogas no tratamento da LV tem como objetivo aumentar a eficácia, diminuir ou prevenir o surgimento de resistência, ou ainda reduzir o tempo de tratamento. A primeira tentativa ocorreu no início da década de 80 com

a associação de alopurinol + estibogluconato de sódio. Estudos não randomizados foram realizados e os resultados foram controversos quanto à superioridade dessa associação em relação à monoterapia (CHUNGE et al., 1985; DI-MARTINO et al., 1990; RAGUSA et al., 1993; SINGH et al., 1995). Sendo assim, o uso dessa combinação nunca chegou a ser implantada na prática. Posteriormente avaliou-se a associação da pentamidina + estibogluconato de sódio. Os estudos foram unânimes em mostrar que não havia uma interação positiva entre as drogas e concluíram que apesar da pentamidina ser efetiva no tratamento da LV, esquemas mais prolongados seriam necessários para prevenir recidivas, tornando sua toxicidade muito elevada (BRYCESON et al., 1985b). Mais tardiamente, um ensaio clínico randomizado e controlado realizado em pacientes que não haviam respondido ao tratamento com antimoniais mostrou que a associação alopurinol + pentamidina apresentava índices de cura superiores a monoterapia com pentamidina, sendo utilizado em dias alternados durante 30 dias (DAS et al., 2001). A associação aminosidina + estibogluconato de sódio também já foi testada (THAKUR & KUMAR, 1992; SEAMAN et al., 1993; THAKUR et al., 1995b) e mostrou-se mais eficaz que a aminosidina isoladamente em pacientes indianos com LV, apesar da ototoxicidade e nefrotoxicidade inerentes aos aminoglicosídeos.

Devido provavelmente ao receio pela grande toxicidade, a combinação de antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B até então nunca havia sido testada. Resultados recentes do nosso grupo demonstraram a eficácia dessa associação no tratamento de pacientes portadores de leishmaniose visceral, com redução do tempo de tratamento para 7 ou 10 dias (CARVALHO, 2005). Tal estudo pôde evidenciar que essa associação foi capaz de diminuir o tempo do tratamento sem, no entanto, perder a eficácia do mesmo, e dessa forma reduzir os índices de recidiva relacionados ao abandono do tratamento em virtude do longo período da terapia. Entretanto, não existem dados na literatura referentes à avaliação do efeito da associação do antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B como suporte para esse achado clínico. Neste contexto, estudos

utilizando modelos experimentais ainda se fazem necessários para que se possa classificar a natureza da interação das drogas utilizadas nessa associação.

Além da associação de drogas, vários estudos têm sido realizados no sentido de desenvolver e avaliar novas drogas ou novas formulações de drogas já existentes no tratamento das leishmanioses. Devido ao seu alto poder leishmanicida, a anfotericina B vem se tornando alvo de intensa pesquisa, a fim de atenuar principalmente seus efeitos nefrotóxicos, e aumentar o seu potencial terapêutico. Neste contexto, devido à necessidade de excluir o desoxicolato como agente dispersante, vesículas de fosfolípidos conhecidas como lipossomas, têm sido utilizadas como um sistema de vetorização para a administração da AMB.

Em 1965, Bangham e colaboradores observaram que pequenas vesículas, consistindo de uma bicamada lipídica, poderiam se formar quando fosfolípidos fossem hidratados com a adição de água. Essas vesículas, posteriormente chamadas de lipossomas, foram classificadas de acordo com o número de bicamadas lipídicas e com o tamanho das vesículas. Dessa forma, os lipossomas poderiam se comportar como vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV).

New e colaboradores, no ano de 1981, investigaram pela primeira vez o efeito da anfotericina B incorporada em lipossomas (anfotericina B lipossomal – L-AmB) utilizando um modelo experimental de infecção por *Leishmania*, no qual observaram uma menor toxicidade em relação a AMB e despertaram a possibilidade do tratamento com doses mais elevadas. O mesmo foi observado, posteriormente, em modelos de histoplasmose (TAYLOR et al., 1982; GRAYBILL & BOCANERA, 1985), cryptococose (GRAYBILL et al., 1982) e candidíase (LOPEZ-BERESTEIN, et al., 1983; TREMBLAY et al., 1984).

Drogas incorporadas a lipossomas mostraram-se também, distribuir-se principalmente em tecidos do sistema reticuloendotelial, incluindo fígado, baço e pulmões (ABRA & HUNT, 1981); além de participar de um mecanismo de transferência seletivo, capaz de transferir os lipossomas para alvos contendo

ergosterol nas membranas celulares do parasito ajudado pelo próprio parasito ou fosfolipases do hospedeiro (JULIANO et al., 1987).

A partir da década de 90, formulações lipídicas na forma de complexo lipídico (Abelcet[®], The Liposome Co., Princeton, NJ), dispersão coloidal (Amphotec[®], Sequus Pharmaceuticas, Menlo Park, CA) e lipossomas (AmBisome (NeXstar Pharmaceuticals/Fujisawa, San Dimas, CA) ganharam o mercado após aprovação pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration).

Em geral, as preparações lipídicas disponíveis de AMB facilitaram o tratamento da LV em modelos animais e humanos, devido à diminuição extraordinária da toxicidade, principalmente em virtude da liberação do desoxicolato como agente dispersante, da facilitação da farmacocinética da droga e auxílio à resposta imune do hospedeiro (PETIT et al., 1999; FALK et al., 2004; EHRENFREUND-KLEINMAN, et al., 2005). Entretanto, o uso dos compostos lipídicos de AMB ainda encontra-se limitado em função do alto custo (MURRAY, 2004) e da instabilidade da formulação.

A OMS, frente à necessidade imperiosa de novos fármacos para o tratamento das doenças parasitárias, vem incentivando o estudo de compostos que possam abrir novas perspectivas para a pesquisa de medicamentos mais eficazes (WHO, 1990). Sendo assim, o desenvolvimento de uma droga oral é de extrema importância pela possibilidade de diminuir o tempo de hospitalização, bem como a toxicidade decorrente da via de administração, o que permite maior aderência do paciente ao tratamento e conseqüentemente maior índice de cura.

Neste contexto, a terapia oral utilizando a miltefosina (Zentaris, Alemanha) como droga anti-*Leishmania* foi iniciada com estudos do metabolismo de fosfolipídeos em promastigotas de *L. (L.) donovani* na década de 80 (HERMANN & GERCKEN, 1982). Atualmente, a droga tem sido utilizada com sucesso para o tratamento da LV na Índia, com um índice de cura de 94%, incluindo os casos resistentes ao tratamento convencional com os antimoniais pentavalentes (SUNDAR, 2002). Entretanto, por se tratar de uma alcilfosfocolina originalmente desenvolvida como

droga anti-câncer, é um fármaco com alto potencial teratogênico, de custo elevado e que apresenta restrições para seu uso. (JHA et al., 1999; GUERIN et al., 2002, AGRAWAL et al., 2005). No ano de 2005, o nosso grupo iniciou pela primeira vez no Brasil, um ensaio clínico para avaliar a eficácia da miltefosina em pacientes portadores de LV. Diferente dos resultados encontrados nos ensaios clínicos desenvolvidos na Índia, cerca de 50% dos pacientes apresentou falha terapêutica levando à interrupção do estudo.

Ainda no sentido de avaliar drogas com atividade anti-*Leishmania* com potencial oral de administração, nosso grupo iniciou uma colaboração com a BioDelivery Sciences International - USA, para estudar a atividade anti-*L.(L.) chagasi* de uma nova formulação lipídica de anfotericina B encapsulada pelo sistema de cocleamento. A anfotericina B cocleada apresenta vantagens sobre as formulações lipídicas já existentes devido à estabilidade dos “cochleates” e sua resistência à degradação no trato gastrointestinal o que pode favorecer sua administração por via oral.

A tecnologia do cocleamento foi inicialmente descrita por Papahadjopoulos, em 1975, quando descobriu um intermediário na preparação de vesículas unilamelares, os “cochleates”. “Cochleates” consistem em uma estrutura cristalina estável cátion-fosfolipídica (Ca^{++} e fosfatidilserina) em forma de uma bicamada em espiral com um espaço interno não aquoso e livre de oxigênio. Essa estrutura permite um aumento significativo na estabilidade dos seus constituintes, devido à diminuição das ações enzimáticas degradativas diretas, favorecendo a veiculação de moléculas anfipáticas, hidrofóbicas, carregadas positivamente e negativamente. Os “cochleates” têm sido utilizados como sistema de distribuição de proteínas, peptídeos, vacinas de DNA e em terapias gênicas (MANNINO & GOUD-FOGERITE, 1995; ZARIF & MANNINO, 2000). Recentemente, seu uso tem sido essencialmente empregado em sistemas de distribuição de drogas, tal qual a anfotericina B (ZARIF et al., 2000). Por se tratar de uma droga hidrofóbica, a anfotericina B encontra-se distribuída entre as bicamadas de fosfatidilserina contidas na estrutura dos “cochleates” (Figura 2).

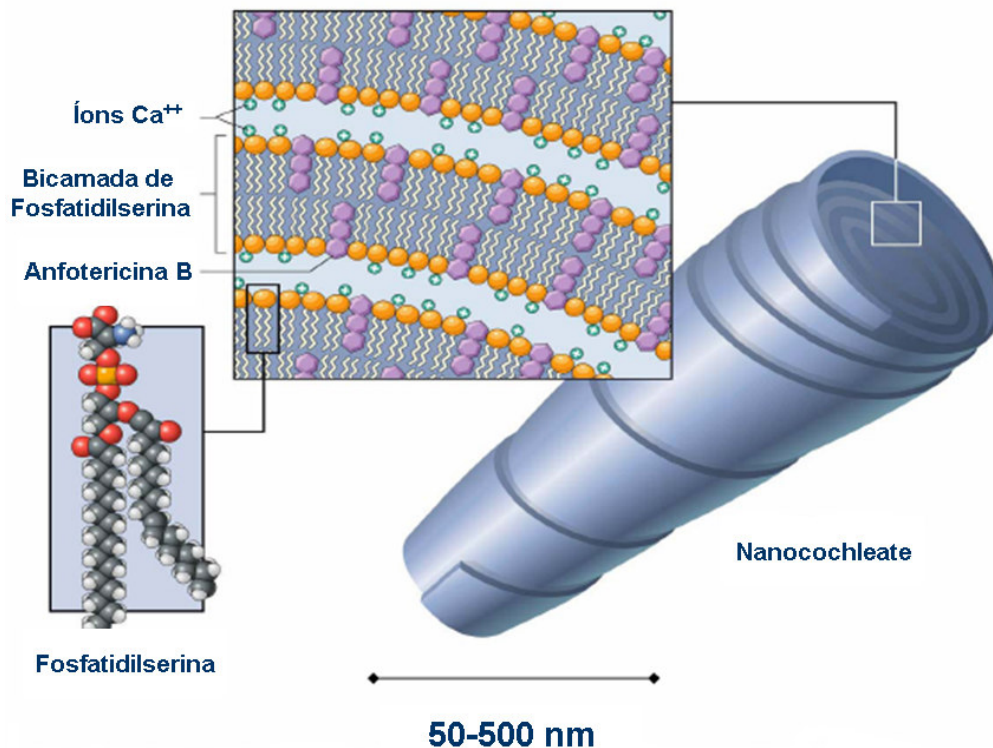


Figura 2 – Estrutura do nanocochleate contendo a anfotericina B
 Fonte: www.biodeliverysciences.com (Acesso em 16 julho 2006).

Estudos iniciais de biodistribuição da CAMB administrada por via intravenosa em modelos murinos demonstraram que a anfotericina B administrada através do sistema de cocleamento é órgão-específica (SEGARRA et al., 2002). A distribuição das moléculas bioativas ocorre quando os “cochleates” contendo a droga se aproximam da célula fagocítica promovendo a reorganização da membrana plasmática. Isso ocorre em função da interação dos íons Ca⁺⁺ contidos na membrana do “cochleates” com fosfolípídeos carregados negativamente encontrados na membrana plasmática da célula alvo (geralmente fosfatidilserina e fosfatidilglicerol), o que resulta na fusão da membrana externa do “cochleate” contendo a AMB com a membrana da célula. Essa fusão permite a liberação lenta de pequenas quantidades da droga no interior do citoplasma da célula alvo. Os “cochleates” contendo anfotericina B podem desligar-se da membrana plasmática

da célula fagocítica e reaproximar-se de outra célula ou da mesma, depositando novamente o seu conteúdo. Eventualmente, particularmente em células fagocíticas ativadas, pode ocorrer a endocitose do “cochleate” e a fusão com a vesícula endocítica (Figura 3).

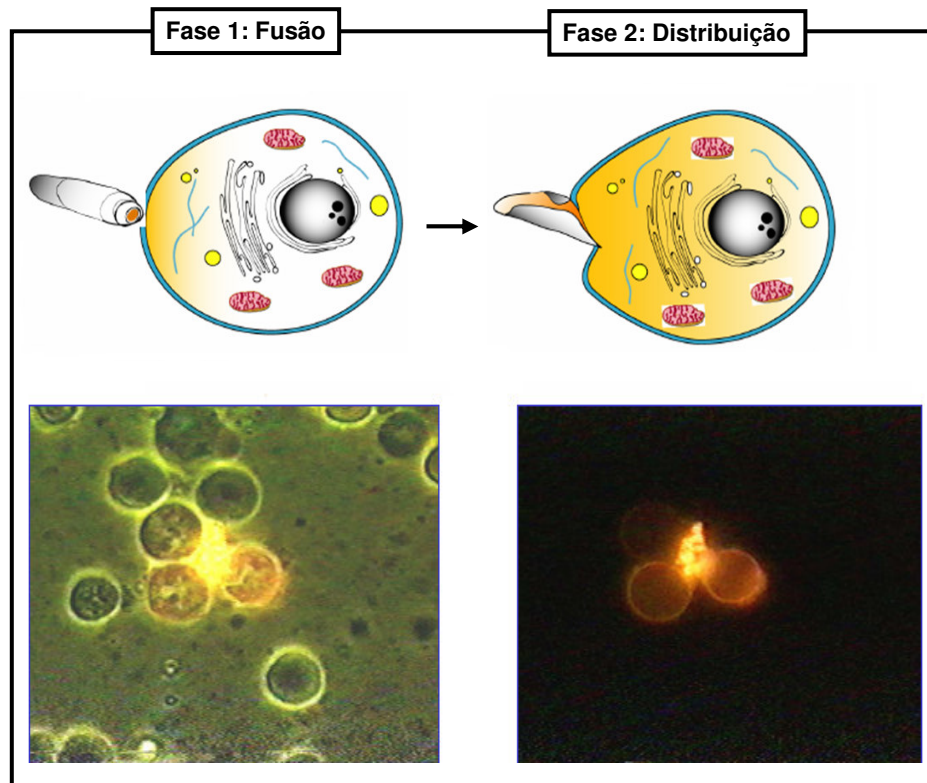


Figura 3 – Mecanismos de fusão dos cochleates e distribuição da anfotericina B dentro das células alvo.

Fonte: www.biodeliverysciences.com (Acesso em 16 julho 2006).

A formulação cocleada da anfotericina B tem se mostrado eficaz no tratamento de infecção experimental com *Candida albicans*. Os dados mostraram que a CAMB administrada via oral na dose de 0,5 mg/Kg/dia promoveu 100% de sobrevivência dos animais e foi comparável ao efeito do desoxicolato de anfotericina B na dose de 2mg/Kg/dia administrada via intraperitoneal (SANTANGELO, 2000). Resultados preliminares da eficácia de CAMB em modelos murinos de

aspergilose mostraram que a administração oral da droga resultou na sobrevivência de 70% dos animais e na redução no número de colônias nos pulmões, fígado e rins (DELMAS et al., 2002). Estes resultados demonstraram que a formulação coclelada da anfotericina B promove sua captação no trato gastrointestinal e sugere a via oral de administração como potencial para aplicação terapêutica.

Portanto, com base nos estudos descritos acima que demonstraram que a associação de antimoniato de meglumina e anfotericina B administrada por um período de tempo inferior ao utilizado para as drogas isoladas foi eficaz no tratamento da LV e diante dos resultados que descreveram a eficácia terapêutica da anfotericina B coclelada no tratamento de infecção fúngica e seu potencial como uma droga de administração oral, nossa proposta foi avaliar o efeito da associação do antimoniato de meglumina e anfotericina B desoxicolato e a atividade da anfotericina B coclelada na infecção experimental com *L. (L.) chagasi*.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da associação de antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B e a atividade da anfotericina B cocleada na infecção experimental com *L. (L.) chagasi*.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar os ensaios de infecção *in vitro* de macrófagos murinos com *L. (L.) chagasi*.
- Avaliar o efeito *in vitro* da associação de antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B em modelos de infecção de macrófagos murinos com *L. (L.) chagasi*.
- Avaliar a atividade *in vitro* anti-*Leishmania* da anfotericina B cocleada em modelos de infecção de macrófagos murinos com *L. (L.) chagasi*.
- Padronizar os ensaios de infecção *in vivo* de camundongos com *L. (L.) chagasi*.
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* da anfotericina B cocleada em modelos de infecção de camundongos com *L. (L.) chagasi*.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e cultivo das formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*

Neste estudo foi utilizada uma cepa padrão da Organização Mundial de Saúde *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). As formas promastigotas inicialmente criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas, cultivadas em meio líquido Liver Infusion Tryptose – LIT (CAMARGO, 1964) até a fase logarítmica de crescimento. Camundongos fêmeas BALB/c com idade entre 4 e 8 semanas foram inoculados com 2×10^7 parasitos via veia lateral da cauda com o objetivo de obtermos uma cultura primária de promastigotas com alta infectividade para a realização dos experimentos. Após 15 dias, os parasitos foram isolados do fígado desses animais por maceração e inoculados em frascos contendo meio bifásico ágar-sangue, Novy-MacNeal-Nicolle – NNN (NOVY & MACNEAL 1903; NICOLE, 1908), associado ao meio LIT. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ durante quatro dias. Após este período, as culturas foram examinadas quanto à motilidade, morfologia e ausência de contaminação, e os parasitos re-inoculados em um novo frasco contendo meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado – SFB (Cultilab - Campinas, SP, BR) e 2% de urina estéril masculina (HOWARD, 1991) para a expansão da cultura e armazenamento no criobanco do Núcleo de Doenças Infecciosas.

Para cada um dos ensaios uma alíquota da cultura de promastigotas foi descongelada do criobanco e cultivada em meio NNN-LIT. A re-inoculação no meio bifásico foi realizada a cada quatro dias com o objetivo de manter os parasitos em fase logarítmica de crescimento. A partir da terceira passagem em meio NNN-LIT, as culturas de quatro dias foram inoculadas (5×10^5 promastigotas/mL) em meio LIT suplementado com 10% de SFB e 2% de urina masculina para serem posteriormente utilizadas nos ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo*. Os parasitos utilizados nos experimentos foram mantidos em cultura, por no máximo, oito passagens, para evitar a perda da infectividade observada após

longo tempo de cultura. Em todos os experimentos foram utilizadas cepas de primeira passagem e mesma data de isolamento.

3.2 Drogas

Foram utilizados o antimoniato de meglumina (Glucantime™) produzido pela Aventis, Brasil, o desoxicolato de anfotericina B (Fungizon™) produzido pela Squibb, NY, USA; o desoxicolato de anfotericina B (Anfotericin B) produzido pela Cristália, RS, Brasil, e a anfotericina B cocleada (CAMB) produzida pela Bio Delivery Sciences International, New Jersey, USA, gentilmente cedida pelo Dr. Raphael Maninno. As drogas foram diluídas em meio RPMI-1640 (SIGMA - St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de SFB imediatamente antes dos ensaios.

3.3 Ensaios *in vitro*

3.3.1 Preparo das formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* para os ensaios *in vitro* de infecção de macrófagos murinos

Parasitas de 7 dias de crescimento, cultivados em meio LIT suplementado com 10% de SFB e 2% de urina masculina, foram transferidos para tubos de polipropileno de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson, San Diego), homogeneizados em vórtex a baixa rotação para desfazer os grumos e submetidos à centrifugação diferencial (200 x g, 25°C, durante 10 minutos) para a remoção das formas não viáveis e grumos de parasitos. Os parasitos foram deixados em repouso durante 10 minutos à temperatura de 24 ± 1°C em estufa B.O.D. para a recuperação dos mesmos no sobrenadante. Após este período, o sobrenadante foi coletado, transferido para outro tubo de polipropileno de 50 mL e lavado em solução salina tamponada - PBS (0,15M, 8,0g/L de NaCl, 0,2g/L de KH₂PO₄ e 1,115g/L de

Na₂PO₄, pH 7,2, Sigma Chemical Corp., St Louis, MO), por centrifugação a 1000 x g, 4°C, durante 10 minutos. Ao final das etapas de lavagem, o sedimento contendo as promastigotas foi ressuspendido em 5 mL de meio RPMI – 1640 suplementado com 10% SFB para a contagem do número de parasitos em câmara de Neubauer e posterior ajuste da sua concentração para os ensaios de infecção de macrófagos.

3.3.2 Ensaios *in vitro* de atividade de drogas anti-*Leishmania*

Para os experimentos *in vitro*, foram utilizados camundongos suíços fêmeas com idade entre 4 e 8 semanas adquiridos do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF). Macrófagos peritoneais residentes foram obtidos por lavagem com meio RPMI-1640, centrifugados a 500 x g, 4°C por 10 minutos e ressuspendidos em 5 mL de meio RPMI-1640. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando um corante vital (Azul de Tripán a 0,4%) com o objetivo de excluir da contagem as possíveis células mortas contidas no meio. Posteriormente, o número de macrófagos foi ajustado para uma concentração de 8×10^5 células / mL em meio RPMI-1640 e 100µL dessa suspensão foram distribuídos em câmaras de cultura celular de 16 poços (Lab-Tek® - Chamber Slide™ System, Nunc, NY, USA). As células foram incubadas por 24 horas, a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e atmosfera úmida. Após a incubação, as células não-aderentes foram removidas por lavagem com meio RPMI-1640, os macrófagos aderentes foram infectados com promastigotas de *L. (L.) chagasi* na razão de 7 parasitos / macrófago ($5,6 \times 10^5$ parasitos) e incubados por 24 horas, a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e atmosfera úmida. Após este período, os parasitos não fagocitados foram removidos por lavagem utilizando meio RPMI-1640 e posteriormente foram adicionados, em cada poço da câmara de cultura, 100 µL de meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB. Os macrófagos infectados foram incubados com diferentes concentrações das drogas separadamente ou em associação, em triplicata, e incubados por 72 horas, a

37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e atmosfera úmida. Após 72 horas de exposição às drogas, as lâminas foram fixadas em metanol e coradas utilizando a técnica de Diff-Quick (Fisher Scientific, Atlanta, GA, USA). Para cada ensaio foram avaliados randomicamente 100 macrófagos em cada poço das câmaras de cultura. A atividade da droga foi determinada a partir da porcentagem de macrófagos infectados nas culturas tratadas com droga em comparação com as culturas não tratadas. As concentrações inibitórias de 50% (CI₅₀) e de 90% (CI₉₀) foram calculadas por análise de regressão logarítmica utilizando o programa Microsoft Excel 2003.

3.3.3 Ensaio *in vitro* de associação de drogas com atividade anti-*Leishmania*

Para calcular as concentrações das drogas a serem utilizadas nas diferentes combinações foi utilizado o método da Razão Fixada Modificado proposto por Fivelman e colaboradores em 2004. Inicialmente foram determinadas as CI₅₀ do antimoniato de meglumina (GLU) e do desoxicolato de anfotericina B (DAMB) isoladamente. Para os ensaios de associação foram utilizadas seis combinações de drogas nas seguintes razões: 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, sendo que 5:0 e 0:5 correspondiam às drogas isoladas. Para cada combinação foram realizadas cinco diluições seriadas duplas de modo que a mais alta concentração a ser utilizada (5) correspondia aproximadamente a 4 vezes o CI₅₀ de cada droga isolada. Uma vez determinada a mais alta concentração a ser utilizada, as demais concentrações correspondiam às frações indicadas nas combinações. Os testes *in vitro* foram realizados conforme descrito no item 3.3.2. Cada combinação foi testada em cinco diluições, em triplicata e em 3 experimentos independentes.

Para avaliar o efeito da associação das drogas, foi calculada inicialmente a fração da concentração inibitória (FIC) de cada droga e o somatório das FICs (FIC do DAMB + FIC do GLU) como a seguir: $FIC \text{ do DAMB} = CI_{50(90)} \text{ do DAMB em combinação} / CI_{50(90)} \text{ do DAMB isolado}$. O mesmo foi aplicado para o GLU. As FICs

e o somatório das FICs foram calculados para cada uma das combinações. A média dos somatórios das FICs foi utilizada para classificar a natureza da interação, onde $\Sigma FIC < 0,5$ foi classificado como sinergismo ou interação positiva, $0,5 < \Sigma FIC < 4$ como aditividade ou sem interação e $\Sigma FIC > 4$ como antagonismo ou interação negativa (JOHNSON et al, 2004; ODDS, 2003).

3.3.4 Ensaios de citotoxicidade de drogas

O ensaio de citotoxicidade foi realizado através da técnica de coloração pelo MTT -3,(-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo, que consiste num ensaio semi-automatizado baseado na clivagem do sal tetrazolium pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase formando um produto colorido o formazan. Uma vez que esta conversão depende da presença de células viáveis, a quantidade de produto formado é diretamente proporcional ao número de células vivas em cultura (MOSMANN, 1983).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando-se macrófagos peritoneais de camundongos suíços fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas. As células foram obtidas por lavagem peritoneal em meio RPMI-1640 e ajustadas para uma concentração de 8×10^5 células/mL após contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, 100 μ L da suspensão de células foram adicionados a placas de 96 poços (Linbro[®], McLean, Virginia, USA) e incubados durante 24 horas em estufa a 37 $^{\circ}$ C contendo 5% de CO₂ e atmosfera úmida. Após esse período, as células não aderentes foram retiradas por lavagem e aos poços foram adicionadas diferentes concentrações das drogas diluídas em meio RPMI-1640 e novamente incubadas por 24 horas, a 37 $^{\circ}$ C em estufa contendo 5% de CO₂ e atmosfera úmida. Após a incubação com as drogas, o meio foi removido e aos poços foi adicionado 50 μ L de meio LIT e 50 μ L de MTT a 1mg/mL diluído em meio LIT. A cultura foi incubada por 4 horas no escuro, a 37 $^{\circ}$ C em estufa contendo 5% de CO₂ e atmosfera úmida. Após esse período, a placa foi centrifugada a 1000 X g, a 4 $^{\circ}$ C durante 15 minutos. O meio foi removido e o produto formado foi diluído em 200 μ L de DMSO. A

absorbância foi medida em leitor de ELISA a 570 nm e a porcentagem de lise celular foi calculada dividindo a média da absorbância de cada concentração de droga pela média da absorbância dos controles sem droga, multiplicada por 100. Os resultados foram expressos como a média de 3 experimentos independentes.

3.4 Ensaio *in vivo*

3.4.1 Preparo das formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* para os ensaios de infecção *in vivo*.

Parasitas em fase logarítmica de crescimento (5 dias), cultivados em meio LIT suplementado com 10% de SFB e 2% de urina masculina, foram previamente observados quanto ao aspecto e a motilidade e contados em câmara de Neubauer. Em seguida, a cultura contendo os parasitos foi transferida para tubos de polipropileno de 15 mL (Falcon[®], Becton Dickinson, San Diego), homogeneizada em vórtex a baixa rotação para desfazer os grumos e lavada 2 vezes por centrifugação a 1000 x g, 4°C, durante 10 minutos utilizando PBS. Ao final das etapas de lavagem, o sedimento contendo as promastigotas foi ressuscitado em volume de RPMI-1640 suficiente para a concentração final de 1×10^8 parasitos/mL.

3.4.2 Curva de infecção de camundongos com *L. (L.) chagasi*

Camundongos fêmeas BALB/c com idade entre 4 e 6 semanas infectados com 2×10^7 promastigotas via intravenosa foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 2 camundongos. Os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂ após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção e determinado a carga parasitária no fígado dos camundongos.

3.4.3 Quantificação dos parasitos no fígado dos camundongos infectados com *L. (L.) chagasi*

Para a quantificação dos parasitos no fígado dos animais infectados foi utilizada a técnica da Diluição Limitante descrita por Buffet e colaboradores em 1995. Para tal, o fígado do animal foi retirado assepticamente e dividido em dois fragmentos que foram pesados. O fragmento menor foi macerado em meio RPMI-1640, transferido para um tubo de polipropileno de 15 mL e centrifugado a 200 x g, 4°C por 1 minuto para retirar a cápsula que recobre o fígado que é resistente à maceração (cápsula de Glisson). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno de 15 mL, centrifugado a 1500 x g, 4°C, por 10 minutos e o sedimento ressuspendido em 500 µL de meio LIT suplementado com 10% de SFB e 2% de urina masculina. Essa suspensão foi posteriormente distribuída em placas de fundo chato de 96 poços, em duplicata, onde aos primeiros poços foram adicionados 200 µL da suspensão e nos demais poços 160 µL de LIT suplementado com 10% de SFB e 2% de urina masculina. Após a distribuição do meio, foram feitas diluições 1:5, transferindo-se 40 µL de poço em poço, até o décimo segundo poço. Para a determinação das diluições em cada poço foram utilizados os valores de acordo com a tabela 1. O primeiro poço representa a diluição 1:3 uma vez que dos 500 µL nos quais foi ressuspendido o macerado de tecido, foram utilizados apenas 160 µL no primeiro poço e os demais poços representam diluições seriadas de 5 vezes.

As placas foram incubadas em estufa B.O.D. à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e avaliadas diariamente durante 10 dias. No décimo dia de cultura a quantidade de parasitos no fígado foi calculado multiplicando o inverso da diluição referente ao poço em que havia a presença de pelo menos um parasita, pelo peso total do órgão e dividindo pelo peso do fragmento utilizado para a cultura.

Ex: último poço: 5

Diluição: $1/1,88 \times 10^3$

Peso total do fígado: 1,5 g

Peso do fragmento utilizado: 0,06

Quantidade de parasitas por órgão:	
$1,88 \times 10^3$	----- 0,06 g
X	----- 1,5 g

$$X = 4,7 \times 10^4 \text{ parasitos / órgão}$$

TABELA 1 – INVERSO DA DILUIÇÃO DO MACERADO DO FRAGMENTO DE FÍGADO

1º poço: 3	4º poço: 375	7º poço: $4,69 \times 10^4$	10º poço: $5,86 \times 10^6$
2º poço: 15**	5º poço: $1,88 \times 10^3$	8º poço: $2,34 \times 10^5$	11º poço: $2,93 \times 10^7$
3º poço: 75	6º poço: $9,38 \times 10^3$	9º poço: $1,17 \times 10^6$	12º poço: $1,47 \times 10^8$

* Representação da fração do macerado utilizada a partir do volume total ressuspendido (160 µL/ 500 µL)

** Diluição seriada 1:5

3.4.4 Ensaios de atividade de drogas anti-*Leishmania* in vivo

Camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 4 e 8 semanas infectados com 2×10^7 promastigotas via intravenosa foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 camundongos. Após 15 dias de infecção, os camundongos foram tratados com diferentes concentrações de CAMB e DAMB durante 7 e 15 dias. A CAMB foi

administrada por via oral e o DAMB por via intraperitoneal. Vinte e quatro horas após o término do tratamento, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂ e o número de parasitos no fígado foi calculado pela técnica de diluição limitante conforme descrito anteriormente. O resultado foi expresso como a média dos logaritmos do número de parasitos por órgão de cada camundongo.

3.5 Aspectos éticos

O presente estudo foi realizado conforme as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e em concordância com a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática didático-científica de conduta em pesquisas utilizando animais.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Padronização dos ensaios *in vitro* de infecção de macrófagos com *L. (L.) chagasi*

Inicialmente foi determinado o número de macrófagos a ser adicionado em cada poço das câmaras de cultura de modo a obter uma distribuição homogênea das células e avaliar o número de macrófagos aderidos após 72 horas de incubação. Para isso foram testadas as quantidades de 4×10^4 e 8×10^4 macrófagos por poço. Após 72 horas de incubação, a adição de 4×10^4 macrófagos por poço não permitiu que uma quantidade suficiente de células permanecesse aderida. Por outro lado, quando utilizamos 8×10^4 macrófagos foi observado uma distribuição homogênea e um maior número de células aderidas após 72 horas. A partir dessa observação todos os experimentos *in vitro* foram realizados utilizando 8×10^4 macrófagos em cada poço das câmaras de cultura.

Na próxima etapa da padronização, foi avaliado o número de promastigotas por macrófago com o objetivo de obter uma maior taxa de infecção. Neste ensaio foram avaliadas as razões 7:1 e 10:1 de parasitos por macrófago utilizando promastigotas de *L. (L.) chagasi* obtidas de uma cultura de 7 dias, que correspondia ao início da fase estacionária de crescimento. Nossos dados demonstraram que apesar da razão 10:1 apresentar uma taxa de infecção maior em relação à razão 7:1 após 72 horas de incubação, a razão de 7:1 parasitos / macrófago foi escolhida para ser utilizada nos experimentos de infecção *in vitro* devido ao aspecto mais limpo e homogêneo da cultura (Figura 4).

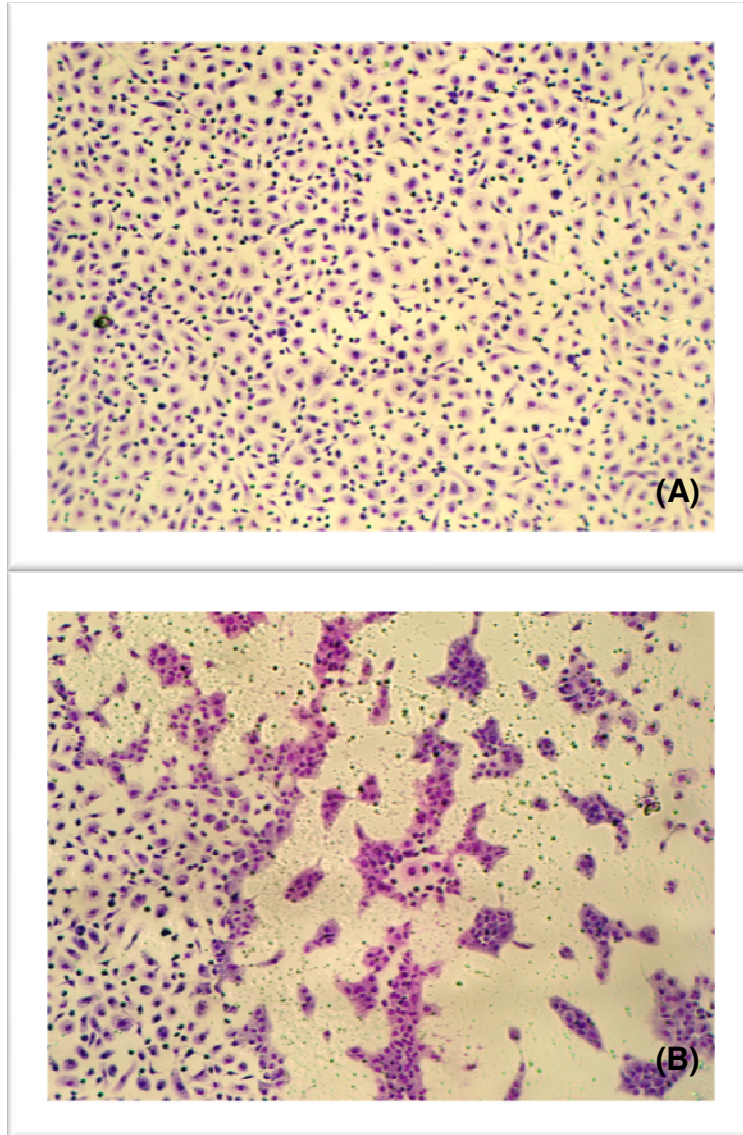


Figura 4 – (A) Distribuição dos macrófagos nas câmaras de cultura quando infectados com a razão de 7:1 parasitos / macrófago (B) Distribuição dos macrófagos nas câmaras de cultura quando infectados com a razão de 10:1 parasitos / macrófago. Fotografias obtidas com uma ampliação de 100X.

4.2 Avaliação *in vitro* do efeito da associação de antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B

Inicialmente foram avaliadas diferentes concentrações do antimoniato de meglumina (Glucantime® - GLU) e do desoxicolato de anfotericina B (DAMB) com o objetivo de estabelecer uma faixa de concentração suficiente para determinar as concentrações inibitórias de 50% e de 90% (CI₅₀ e CI₉₀). Para o GLU foram testadas as concentrações de 200 a 1,56 µg/mL e para o DAMB foram testadas as concentrações de 0,312 a 0,0005 µg/mL. Para ambas as drogas cada uma das concentrações foram testadas em diluições seriada dupla e em triplicata. Os resultados mostraram que as concentrações entre 100 e 3,125 µg/mL para o GLU e 0,078 e 0,002 µg/mL para o DAMB corresponderam aos melhores intervalos de concentrações a serem utilizados, uma vez que culturas tratadas com concentrações acima das concentrações selecionadas apresentaram 100% de inibição da infecção dos macrófagos e aquelas tratadas com concentrações abaixo do limite inferior não apresentaram efeito sobre a infecção dos macrófagos.

A etapa seguinte foi determinar as CI_{50/90} de cada uma das drogas isoladas pela análise da porcentagem de macrófagos infectados tratados em relação ao controle não tratado (Tabela 2).

TABELA 2 – ATIVIDADE *IN VITRO* DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA E DO DESOXICOLATO DE ANFOTERICINA B CONTRA AMASTIGOTAS DE *L. (L.) chagasi*

Drogas	CI ₅₀ *	CI ₉₀ *
GLU	22,5 ±5,6	78,4 ±10,8
DAMB	0,021 ±0,006	0,090 ±0,023

*Os valores de CI₅₀ e CI₉₀ foram expressos como a média e desvio padrão em µg/mL.

Uma vez determinadas as CIs de cada droga separadamente, foram calculadas as concentrações a serem utilizadas nas diferentes combinações conforme demonstrado na tabela 3.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINA E DESOXICOLATO DE ANFOTERICINA B UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ASSOCIAÇÃO DE DROGAS

Soluções de Combinação	Razões		Concentrações (µg/mL)	
	Droga A	Droga B	GLU	DAMB
A	5	0	100	0
B	4	1	80	0,4
C	3	2	60	0,8
D	2	3	40	0,12
E	1	4	20	0,16
F	0	5	0	0,20

O efeito da associação foi avaliado utilizando o método da Razão Fixada Modificado e os dados foram analisados a partir das $CI_{50/90}$ das drogas em combinação e dos cálculos dos $\Sigma FICs$ das diferentes combinações. As interações foram classificadas de acordo com o somatório das frações das concentrações inibitórias, ou seja, $\Sigma FIC < 0,5$ = sinergismo ou interação positiva, $0,5 > \Sigma FIC < 4$ = aditividade ou sem interação, $\Sigma FIC > 4$ = antagonismo ou interação negativa. Os $\Sigma FICs$ estão representados na tabela 4 como resultado de 3 experimentos independentes. Os resultados demonstraram que o efeito da associação entre o antimoniato de meglumina e a anfotericina B desoxicolato foi classificado como aditivo uma vez que a média dos $\Sigma FICs$ variou de 0,65 a 1,02 para o CI_{50} e entre 0,91 e 1,08 para o CI_{90} .

TABELA 4 – MÉDIA DO ΣFICs DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O ANTIMONIATO DE MEGLUMINA E DESOXICOLATO DE ANFOTERICINA B EM ENSAIOS *IN VITRO* DE INFECÇÃO COM *L. (L.) chagasi*

Drogas	Experimento	Média do ΣFIC ± DP* (CI ₅₀)	Média do ΣFIC ± DP* (CI ₉₀)
GLU + DAMB	1	1,02 ± 0,17	1,08 ± 0,14
	2	0,65 ± 0,25	0,91 ± 0,10
	3	0,94 ± 0,13	0,97 ± 0,07

*Desvio Padrão

4.3 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* da anfotericina B cocleada

4.3.1 Análise da citotoxicidade da anfotericina B cocleada

Para determinar a faixa de concentração da droga necessária para obtermos as concentrações inibitórias desejadas, o primeiro passo foi avaliar as concentrações tóxicas para os macrófagos. Sendo assim, a citotoxicidade da anfotericina B cocleada em macrófagos murinos foi avaliada através da técnica de coloração pelo MTT. Como controle foi utilizado o desoxicolato de anfotericina B. Foram testadas as concentrações de 5,00, 2,50, 1,25 e 0,62 µg/mL da CAMB e do DAMB.

Após a análise dos resultados, foi observada uma toxicidade menor da CAMB em relação à DAMB nas culturas de macrófagos. A porcentagem de células vivas nas culturas tratadas com CAMB na concentração de 5,00 µg/mL foi reduzida em 14,1%, enquanto as culturas tratadas com DAMB na mesma concentração apresentaram um decréscimo de 77,0% no número de células vivas, representando uma diferença de 63,0% na sobrevivência das células em relação às culturas tratadas com CAMB (Figura 5). A partir da concentração de 2,50 µg/mL da CAMB não foi mais detectado morte das células, demonstrando assim

que o efeito tóxico da CAMB ocorre em concentrações acima de 2,50 µg/mL. Apenas na concentração 0,62 µg/mL foi observada a mesma porcentagem de sobrevivência dos macrófagos para as duas drogas avaliadas, ou seja, 100,0% das células permaneceram viáveis.

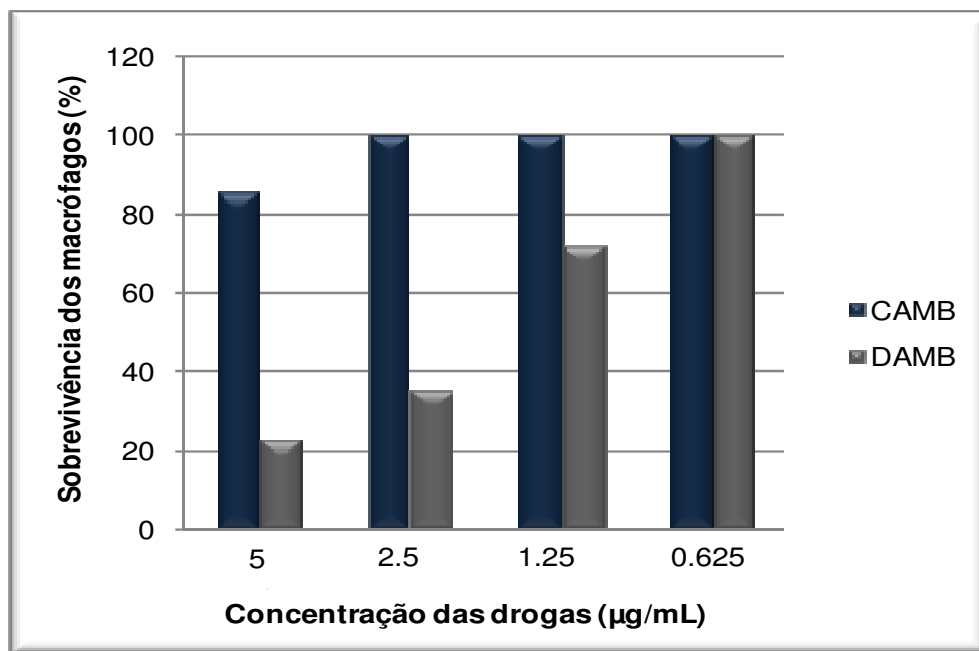


Figura 5 – Porcentagem de macrófagos vivos quando tratados com diferentes concentrações de CAMB e DAMB nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

4.3.2 Atividade *in vitro* da anfotericina B cocleada em ensaios de infecção de macrófagos com *L. (L. chagasi)*

Inicialmente foram avaliadas diferentes concentrações da CAMB com o objetivo de estabelecer uma faixa de concentração suficiente para determinar as concentrações inibitórias de 50% e de 90% (CI₅₀ e CI₉₀). Foram testadas as concentrações de 2,50 a 0,0005 µg/mL em diluição seriada dupla e em triplicata (Figura 6). Os resultados mostraram que as concentrações entre 0,078 e 0,002 µg/mL corresponderam ao melhor intervalo de concentração a ser avaliado nos experimentos *in vitro*, uma vez que as culturas tratadas com concentrações acima

de 0,078 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram 100,0% de inibição da infecção dos macrófagos e aquelas tratadas com concentrações abaixo de 0,002 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram efeito sobre a infecção.

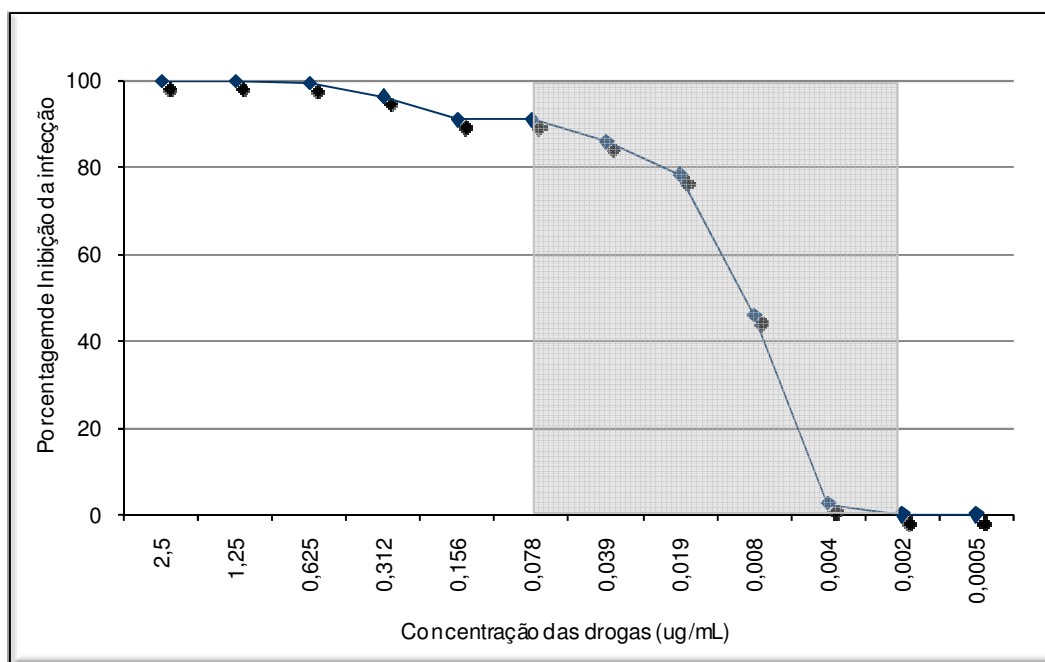


Figura 6 – Análise das concentrações das drogas a serem testadas nos ensaios de atividade anti-*Leishmania*. O gráfico representa a porcentagem de inibição da infecção de macrófagos tratados com diferentes concentrações de CAMB.

Como controle, os “cochleates” sem a droga foram avaliados para verificar se apresentavam atividade anti-*Leishmania*. Nesta etapa, foram realizados ensaios de infecção *in vitro* utilizando a concentração de 2,50 $\mu\text{g/mL}$ que correspondia à maior concentração da CAMB avaliada. Os resultados mostraram que os “cochleates” vazios não apresentam nenhum efeito sobre a infecção dos macrófagos.

Em seguida, as $CI_{50/90}$ foram determinadas pela porcentagem de macrófagos infectados tratados com as diferentes drogas em comparação com o controle não tratado, examinando-se randomicamente 100 macrófagos corados pela técnica de

Diff-Quick. Como controle foi utilizado o DAMB nas mesmas concentrações determinadas para os ensaios com CAMB. Os resultados mostraram que a CAMB e o DAMB apresentaram atividade anti-*Leishmania* semelhantes como demonstrado na tabela 5. Culturas de células tratadas com diferentes concentrações da CAMB podem ser visualizadas na figura 7.

**TABELA 5 – ATIVIDADE *IN VITRO* DE ANFOTERICINA B COCLEADA
CONTRA AMASTIGOTAS DE *L. (L.) chagasi***

	CI ₅₀ *	CI ₉₀ *
CAMB	0,017 ± 0,007	0,059 ± 0,014
DAMB	0,021 ± 0,006	0,090 ± 0,023

*Os valores de CI₅₀ e CI₉₀ foram expressos como a média e desvio padrão em µg/mL.

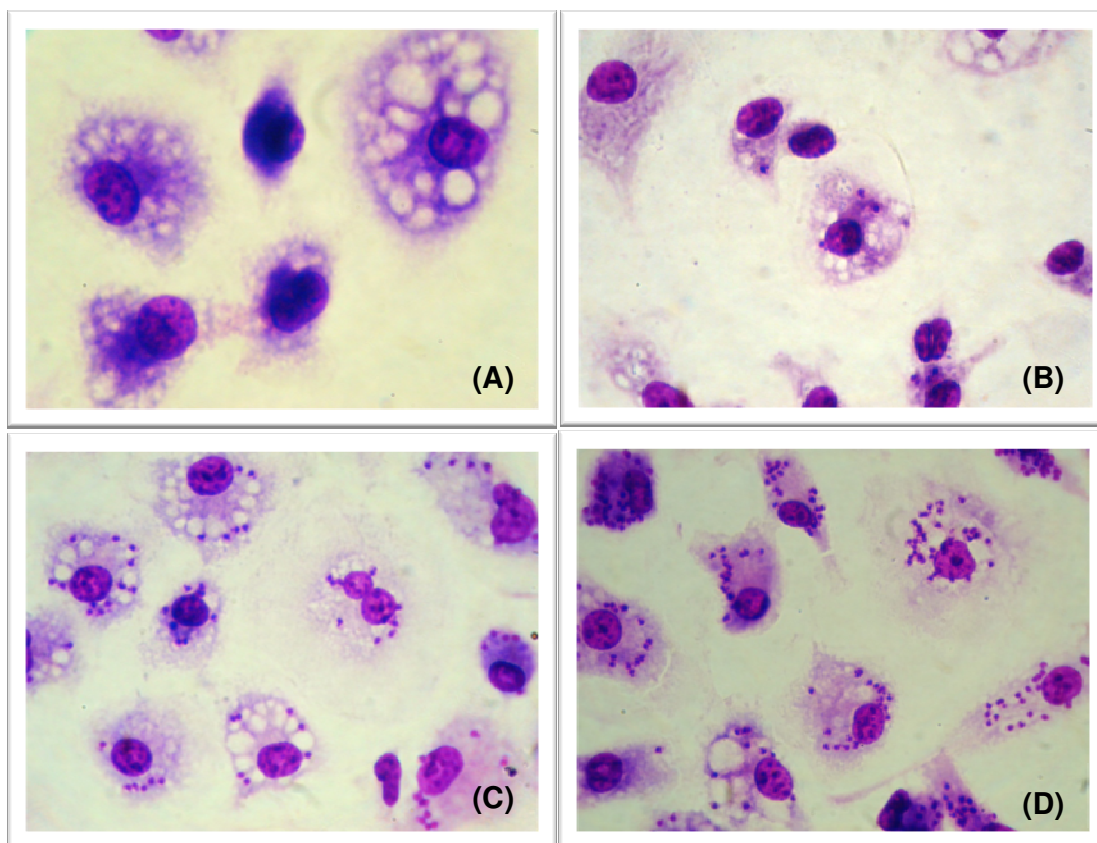


Figura 7 – Cultura de macrófagos murinos infectados com *L.(L.) chagasi* tratados com diferentes concentrações de CAMB (A) CAMB 0,078 µg/mL, (B) CAMB 0,019 µg/mL, (C) CAMB 0,002 µg/mL, (D) Controle de Infecção sem droga.

4.3.3 Comparação da atividade anti-*Leishmania* do desoxicolato de anfotericina B produzida por diferentes fabricantes

Durante o período de realização dos ensaios *in vitro*, a empresa Squibb deixou de produzir o desoxicolato de anfotericina B que utilizávamos em nossos estudos (FungizonTM), sendo assim, nosso trabalho passou a ser realizado com o desoxicolato de anfotericina B produzido pela fabricante Cristália (Anfotericin B). Dessa forma, fizemos uma comparação dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* com as drogas de ambos os fabricantes para descartar qualquer tipo de

interferência em nosso estudo. A análise dos resultados não demonstrou diferença significativa entre as duas formas comerciais da droga. (Figura 8).

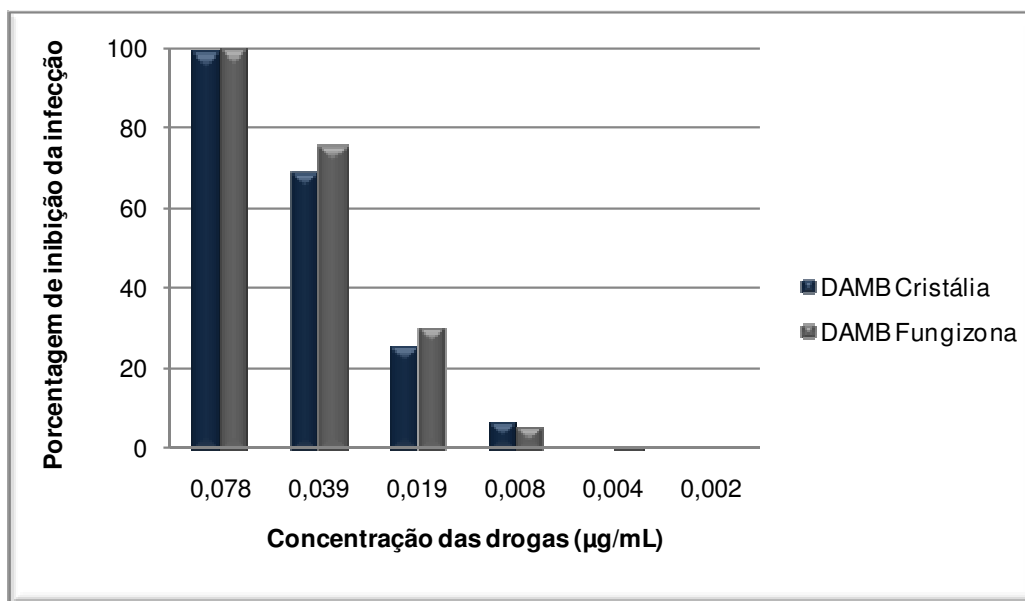


Figura 8 – Comparação da atividade do desoxicolato de anfotericina B produzido por diferentes fabricantes em ensaios *in vitro* de atividade anti-*Leishmania*. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição da infecção nos macrófagos infectados tratados com diferentes concentrações das drogas.

4.3.4 Padronização dos ensaios de infecção *in vivo*

4.3.4.1 Curva de infecção de camundongos com *L. (L.) chagasi*

Com o objetivo de determinar o curso da infecção de camundongos com *L. (L.) chagasi* foi realizada uma curva de infecção. A análise da curva permitiu a determinação dos dias de tratamento dos animais, que foi iniciado após o estabelecimento da infecção (Figura 9). A avaliação dos dados mostrou que a carga parasitária no fígado cresce até a quarta semana após a infecção. A partir

desse momento ocorre um declínio do número de parasitos / órgão, o que é observado em 6 semanas. A partir da análise da curva o 15º dia foi escolhido para o início do tratamento por constituir a fase onde a infecção está bem estabelecida.

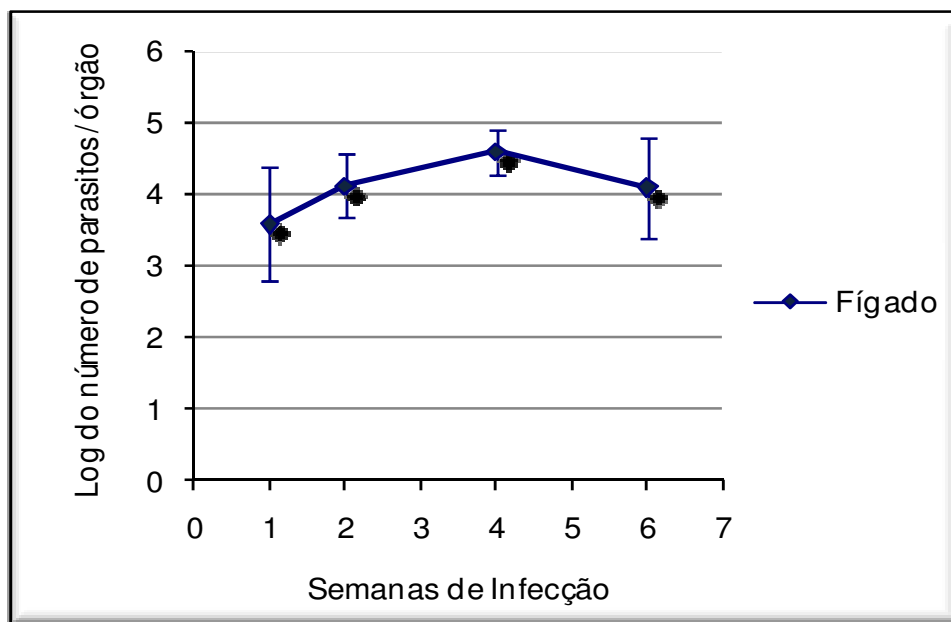


Figura 9 – Curva de infecção no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) chagasi* (cepa PP75). Foram utilizados dois camundongos por grupo e os pontos são representativos das médias dos dados de dois experimentos independentes +/- desvio padrão.

4.3.4.2 Ensaio *in vivo* de atividade anti-*Leishmania*

Quinze dias após a infecção, foi iniciado o tratamento dos camundongos infectados utilizando as doses de 1,0, 0,5 e 0,1 mg/Kg/dia durante 7 dias. Após a avaliação dos resultados foi observado que as doses da CAMB não foram suficientes para a diminuição do número de parasitos no fígado em relação ao controle sem a droga. Nos camundongos tratados com o DAMB na mais alta concentração, a diminuição do número de parasitos foi apenas de 47,2%, provavelmente devido ao curto tempo de tratamento ou a baixa dosagem

utilizada. Portanto, um segundo experimento foi realizado aumentando o tempo de tratamento para 15 dias e utilizando as doses de 1 e 5 mg/Kg/dia para CAMB e DAMB. Os resultados mostraram que a CAMB ainda permaneceu inativa nas doses e tempo de tratamento avaliados, no entanto, o DAMB mostrou-se altamente eficaz observando-se ausência completa de parasitos no fígado após o tratamento com ambas as doses (Tabela 6).

TABELA 6 – ATIVIDADE DA ANFOTERICINA B COCLEADA EM ENSAIOS *IN VIVO* DE INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS COM *L. (L.)chagasi*

Drogas	Dose (µg/mL)	Duração do Tratamento (dias)	Vias de administração	Log ₁₀ do número de parasitos / órgão	% Morte
Experimento 1					
Controle				4,51 ± 0,46	
DAMB	0,1	7	IP*	3,38 ± 0,87	25,0
DAMB	0,5	7	IP	2,88 ± 0,57	36,1
DAMB	1	7	IP	2,38 ± 0,45	47,2
CAMB	0,1	7	Oral	4,60 ± 0,64	0
CAMB	0,5	7	Oral	4,60 ± 0,74	0
CAMB	1	7	Oral	4,42 ± 0,29	0
Experimento 2					
Controle				4,27 ± 0,45	
DAMB	1	15	IP	0	100
DAMB	5	15	IP	0	100
CAMB	1	15	Oral	4,53 ± 0,23	0
CAMB	5	15	Oral	4,56 ± 0,56	0

*Intraperitoneal

Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do efeito da associação de antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B na infecção experimental com *L. (L.) chagasi*

Apesar da descoberta da ação leishmanicida dos antimoniais ter sido o fato de maior impacto na epidemiologia da LV, desde a sua primeira utilização no início do século passado até os dias atuais, seus efeitos tóxicos e o longo tempo de tratamento necessário para atingir índices de cura próximos a 100% ainda estão aquém do desejado. Como droga de segunda escolha é utilizado o desoxicolato de anfotericina B, que constitui a droga leishmanicida mais potente existente no mercado, porém seu uso é limitado em virtude de sua alta toxicidade, principalmente renal.

Portanto, a busca constante por medicamentos e esquemas terapêuticos menos tóxicos e mais eficazes é fundamental para que estas barreiras possam ser ultrapassadas. Na última década, dois avanços puderam ser observados nesta área: as novas formulações lipídicas da anfotericina B e a descoberta de uma droga oral com atividade leishmanicida, a miltefosina. As formulações lipídicas tornaram possível o tratamento da doença em período bem mais curto de tempo e com menos efeitos colaterais, entretanto, o alto custo dessas formulações torna inviável sua utilização em maior escala. A miltefosina foi utilizada com sucesso no tratamento da LV na Índia, porém foram observados altos índices de recidiva nos pacientes do Brasil.

O tratamento combinado com diferentes drogas anti-*Leishmania* tem demonstrado eficácia superior em relação ao tratamento monoterápico (CHUNGE, 1985; DIMARTINO et al., 1990; THAKUR & KUMAR, 1992; SEAMAN et al., 1993; RAGUSA et al., 1993; SEAMAN et al., 1993; THAKUR et al., 1995b; THAKUR et al., 2000; DAS et al., 2001), mas a terapia combinada ainda não é padrão para o tratamento da LV devido à disponibilidade limitada de drogas efetivas com

atividade anti-*Leishmania*. Na utilização de uma terapia combinada, a avaliação de suas vantagens sobre as possíveis desvantagens deve ser minuciosamente detalhada, uma vez que o aumento da severidade dos efeitos adversos das drogas é preocupação comum quando tratamos de drogas com atividade anti-*Leishmania*. Por outro lado, como vantagens do tratamento combinado destacam-se a prevenção do desenvolvimento de resistência, a redução do tempo de tratamento e conseqüentemente menor custo, e maior aderência do paciente a terapia.

Estudos de associação envolvendo o antimoniato de meglumina e o desoxicolato de anfotericina B nunca haviam sido testados em virtude da toxicidade potencial observada em ambas as drogas. Em 2005, o nosso grupo realizou um estudo prospectivo controlado com o objetivo de avaliar a eficácia terapêutica, reações adversas, segurança e tolerabilidade dessa associação durante 7 ou 10 dias consecutivos de tratamento. Este estudo justificou-se pelos fatos (1) do desoxicolato de anfotericina B e o antimoniato de meglumina possuírem sítios de ação distintos (2) da toxicidade de ambas as drogas serem tempo e dose dependente (3) das duas drogas apresentarem vias de eliminação distintas. Os resultados desse estudo foram positivos, com índices de cura de 98,4% e 98,3% no tratamento de 7 e 10 dias respectivamente (CARVALHO, 2005).

Considerando a elevada eficácia da associação do antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B no tratamento de pacientes com LV, um dos objetivos do nosso estudo foi avaliar o efeito dessa associação em ensaios de infecção *in vitro* com *L. (L.) chagasi*. A análise da interação entre as drogas utilizando modelos experimentais é fundamental para classificar a natureza da interação como sinérgica, aditiva (indiferente) ou antagônica.

A natureza da interação foi avaliada baseada no estudo de Seifert em 2006 que investigou as interações entre miltefosina e outras drogas anti-*Leishmania*. Para classificar as interações foram utilizados como *cutoffs* a média dos Σ FICs de 0,5 e 4, conforme descrito por Johnson e colaboradores (2004). Essa forma de interpretação se baseia no fato de que as concentrações em cada combinação

foram avaliadas em diluições seriadas duplas e que a mudança em uma única diluição está dentro da faixa do erro experimental. Assim, para um resultado ser sinérgico é necessário que ambas as drogas apresentem um mínimo de queda no CI_{50} de pelo menos 2 diluições e portanto uma queda de 4 vezes na suas concentrações. Por outro lado, antagonismo é declarado quando pelo menos uma das drogas apresente uma aumento do CI_{50} de 4 vezes ou mais.

Utilizando essa abordagem, nosso estudo revelou que o efeito da associação do antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B na infecção *in vitro* de macrófagos murinos com *L.(L.) chagasi*, foi aditivo, ou seja, não houve interação entre as drogas e sim um efeito somatório de suas atividades observadas isoladamente, embora tenha mostrado uma tendência ao sinergismo devido aos valores de média do $\Sigma FICs$ entre 0,65 e 1,02.

Embora os dados obtidos no ensaio clínico desenvolvido por Carvalho (2005) tenham demonstrado a eficácia terapêutica da associação de antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B não foi possível descrever a natureza da interação. Neste estudo foram avaliados 3 grupos terapêuticos: o Grupo I foi tratado com a associação durante 7 dias, o Grupo II foi tratado com a associação durante 10 dias e o Grupo III foi tratado com o desoxicolato de anfotericina B durante 10 dias. Os resultados demonstraram índices de cura de 98,4% para o Grupo I e 98,3% para o Grupo II, enquanto o Grupo III apresentou 85% de cura.

Um provável efeito aditivo pode ser observado quando comparamos a eficácia do tratamento com a associação durante 10 dias com o grupo controle. O grupo que foi tratado apenas com o desoxicolato de anfotericina B durante 10 dias apresentou um índice de cura de 85% enquanto que o grupo de pacientes tratados com a associação apresentou índice de cura próximo a 100%. Portanto, o aumento da eficácia do tratamento foi devido à inclusão do antimoniato de meglumina. Essa observação está de acordo com a definição de que o efeito aditivo em uma combinação é a soma dos efeitos isolados de cada droga (BOVILL, 1998).

Bovill também descreve uma definição para o sinergismo, em que uma interação é dita como sinérgica quando o efeito observado na combinação é maior do que a soma dos efeitos isolados de cada droga. Neste sentido, um sinergismo pode ser sugerido quando avaliamos o grupo tratado com a associação por um período de sete dias. Partindo da hipótese de que o resultado esperado para tratamento com o desoxicolato de anfotericina B isoladamente durante 7 dias seria em torno de 50% uma vez que o tempo preconizado é 14 dias, e que o índice esperado para o tratamento com o antimoniato de meglumina seria de aproximadamente 30% considerando que o tempo de tratamento foi reduzido a um terço do tempo preconizado (20 dias), o índice de cura esperado para o grupo tratado com a associação durante 7 dias seria de 80%. Entretanto, foi observado um índice próximo a 100%, sugerindo um efeito sinérgico entre as drogas.

Ainda que estudos referentes à utilização do antimoniato de anfotericina B na dose diária de 0,5 mg/Kg/dia por 14 dias, que correspondem a dose total utilizada durante 7 dias na dose de 1mg/Kg/dia, tenham demonstrado um índice de cura de 57% e portanto corroboram a hipótese acima, não existem dados na literatura com relação ao tratamento utilizando doses de antimoniato de meglumina inferiores à recomendada. Portanto estudos experimentais utilizando modelos de infecção *in vivo* devem ser desenvolvidos para confirmar os achados encontrados nesses estudos.

Vale ressaltar que os dados *in vitro* são baseados na análise de uma ampla faixa de concentrações e razões entre as drogas a serem avaliadas, enquanto nos ensaios *in vivo* o número de doses avaliadas é limitado. Entretanto, para que seja confirmado o efeito da interação entre as drogas torna-se necessário o uso de modelos de infecção *in vivo* que permitam avaliar a interação sob a influência de fatores farmacocinéticos bem como fatores do hospedeiro.

5.2 Avaliação da atividade da anfotericina B cocleada na infecção experimental com *L. (L.)chagasi*

Devido ao elevado potencial leishmanicida da anfotericina B (AMB), vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de reduzir a toxicidade e aumentar a segurança da droga; a maioria deles utilizando sistemas lipídicos de distribuição. Diferentes sistemas de AMB já estão disponíveis como AmBisome, Amphotec e Abelcet. A farmacocinética da AMB incorporada às novas formulações lipídicas difere grandemente da formulação micelar utilizada (desoxicolato de anfotericina B - DAMB). Diferentes estudos sugerem que drogas incorporadas aos lipossomas, dispersão coloidal, ou outros complexos lipídicos são seletivamente direcionadas ao sistema monocítico fagocitário e concentradas no fígado, baço e pulmão (HIEMENZ & WALSH, 1996). Além disso, as partículas ricas em lipídeos são significativamente menos nefrotóxicas quando utilizadas em doses mais elevadas do que a formulação de DAMB. Entretanto, o uso dessas formulações ainda é restrito devido ao alto custo e instabilidade. Até o momento nenhum desses sistemas de distribuição possui o potencial de administração oral.

A tecnologia do cocleamento descrita por Papahadjoupoulos (1975) permitiu que drogas pouco solúveis, como a AMB, pudessem ser administradas por via oral, uma vez que a estrutura dos “cochleates” rica em lipídeos resulta em uma formulação estável, não tóxica e altamente eficaz, facilitando a distribuição da droga devido a sua seletividade.

Portanto, considerando a eficácia da AMB no tratamento da LV, nós avaliamos pela primeira vez a atividade anti-*Leishmania* de uma nova formulação de anfotericina B, a anfotericina B cocleada (CAMB), em infecções *in vitro* e *in vivo* com *L. (L.) chagasi*.

Iniciamos o nosso estudo avaliando a atividade *in vitro* da CAMB utilizando modelos de infecção de macrófagos com *L. (L.) chagasi*. Nossos resultados demonstraram que a CAMB possui uma atividade semelhante ao DAMB com CI_{50} e CI_{90} de 0,017 e 0,059 $\mu\text{g/mL}$ e de 0,021 e 0,090 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Essa similaridade na atividade *in vitro* da CAMB em relação ao DAMB também foi observada por Zarif e colaboradores (2000) quando avaliaram a atividade da CAMB contra *Cândida albicans*.

Por outro lado, estudos têm demonstrado que as formulações lipídicas de AMB descritas até o momento apresentam diferentes atividades tanto *in vitro* como *in vivo*, baseados nas diferentes características como tamanho e composição lipídica. Yardley e colaboradores em 2000 demonstraram que a atividade *in vitro* do DAMB e da formulação coloidal Amphocil foram semelhantes e apresentaram atividade 100 vezes maior que o Ambisome e 3 vezes maior que o Abelcet em ensaios de infecção de macrófagos murinos com *L. donovani*. Os resultados sugerem que a diferença na atividade das formulações é devido à captação e interação com as células do hospedeiro ao invés da distribuição intracelular. Foi observado que em culturas de células com soro, a anfotericina B inicialmente se liga a HDL e com o tempo se distribui para a LDL regulada por proteínas transportadoras de lipídeos (WASAN, 1997). Amphocil, como o DAMB, é uma mistura micelar de anfotericina B e detergente e assim dissocia-se rapidamente permitindo que a droga se ligue a LDL e seja captada pelos macrófagos infectados. Já Ambisome e Abelcet mantêm a integridade da sua estrutura por longo período o que permite que sejam fagocitados resultando em menor acúmulo da droga dentro da célula e menor atividade intracelular antiparasitária (LEGRAND et al., 1997).

A alta eficácia da CAMB *in vitro* pode ser explicada pela interação direta e fusão com as membranas celulares, ou seja, a fagocitose de CAMB não é um evento obrigatório, a liberação da droga no interior dos macrófagos infectados é dependente da fusão do cálcio e fosfolipídeos carregados negativamente presentes nas membranas do parasito e do hospedeiro (POLLARD et al., 1988, SANCHEZ-MIGALLON et al., 1994).

Posteriormente avaliamos a citotoxicidade *in vitro* da CAMB uma vez que, até então não havia dados na literatura referentes à toxicidade da CAMB em macrófagos. Nossos resultados demonstraram uma toxicidade menor da CAMB em relação ao DAMB, onde os efeitos tóxicos de CAMB e DAMB nas células foram observados em concentrações acima de 2,5 µg/mL e 0,625 µg/mL respectivamente.

A toxicidade induzida pelo DAMB envolve os mecanismos de alteração da permeabilidade celular no hospedeiro que resulta da ligação da droga ao colesterol presente nas membranas celulares dos mamíferos formando complexos entre o colesterol e a droga (BRAJTBURG et al., 1990). Na presença de oxigênio o DAMB sofre auto-oxidação e catalisa a peroxidação lipídica das membranas, resultando em uma maior fragilidade celular e conseqüentemente maior suscetibilidade ao choque osmótico, levando a célula à morte (BRAJTBURG & BOLARD, 1996; BARWICZ et al., 2000).

Uma explicação para a menor toxicidade da CAMB em relação ao DAMB observada em nossos estudos é a própria constituição lipídica da estrutura cocleada, que permite a liberação da droga no interior do macrófago através dos mecanismos de fusão, bem como o tamanho da partícula, resultando em uma eventual fagocitose, o que permite a entrada da droga por uma forma não invasiva e uma melhor distribuição intracelular. Esse mecanismo não permite que a AMB penetre na célula em sua forma agregada, diminuindo, assim, os efeitos tóxicos celulares nos mamíferos. Vale ressaltar que a estrutura em espiral do “cochleate” protege a AMB da oxidação, bem como da posterior peroxidação lipídica das membranas celulares do hospedeiro, o que favorece ainda mais a diminuição da toxicidade da droga.

Para avaliar a eficácia da CAMB como uma droga oral no tratamento da LV experimental, iniciamos o estudo utilizando 3 diferentes concentrações de CAMB, 1,0 mg, 0,5 mg e 0,1 mg/Kg/dia durante 7 dias. Entretanto, nenhum efeito foi observado na carga parasitária independente da dose testada. Quando avaliamos o efeito de DAMB que foi utilizado como controle, verificamos que a dose de 1,0 mg/kg/dia, que correspondia à maior concentração avaliada, reduziu a carga parasitária em 47,2%, sugerindo assim a necessidade do aumento no tempo de tratamento ou na dose. Passamos então a realizar o tratamento durante 15 dias utilizando as doses de 1,0 e 5,0 mg/kg/dia. Neste caso o DAMB mostrou-se altamente eficaz, com o desaparecimento completo dos parasitos no fígado após o tratamento com as duas doses, porém, ainda assim a CAMB não foi eficaz.

Na tentativa de explicar a ineficácia *in vivo* da CAMB foram levantadas duas hipóteses. A primeira delas seria que a estrutura em espiral dos “cochleates” contendo a anfotericina B estaria aberta, liberando a droga, e conseqüentemente expondo-a a ação degradativa das enzimas do trato gastrointestinal impedindo a sua absorção. Neste sentido, avaliamos novamente a toxicidade *in vitro* da CAMB para determinar a validade do cocleamento, já que acreditávamos que uma vez liberada do “cochleate” a anfotericina B poderia ser mais tóxica. Porém os resultados foram semelhantes aos obtidos nos experimentos anteriores, sugerindo que a estrutura mantinha-se perfeita.

Outra possibilidade seria que a dose avaliada foi insuficiente para a ação sobre os parasitos embora Santangelo e colaboradores (2000) tenham demonstrado uma equivalência na atividade *in vivo* da CAMB em relação ao DAMB no tratamento de candidíase. No estudo de Santangelo, a CAMB foi administrada por gavagem em doses que variaram entre 0,5 e 20 mg/kg/dia durante 15 dias e resultou em 100% de sobrevivência dos animais em todas as doses testadas. A dose oral de 2,5 mg/kg/dia de CAMB promoveu a erradicação completa da *Candida* dos pulmões e foi equivalente ao DAMB administrado por via intraperitoneal na dose de 2 mg/kg/dia, enquanto nos rins houve um decréscimo de 3 logs nas unidades formadora de colônias.

Por outro lado, Delmas e colaboradores (2002) avaliando a ação da CAMB em modelos experimentais de aspergilose mostraram que a dose máxima de 40mg/kg/dia não foi capaz de promover 100% de sobrevivência dos animais tratados, demonstrando, assim, que ação da droga é dependente do agente infeccioso.

Apesar dos nossos estudos *in vitro* terem demonstrado uma ação similar entre o desoxicolato de anfotericina B e a forma cocleada, é sabido que os dados *in vitro* podem não ter correlação com os dados *in vivo*, principalmente quando tratamos da comparação de drogas com diferentes via de administração. Portanto, ainda são necessários estudos *in vivo* com doses mais elevadas para concluirmos sobre a eficácia da anfotericina B cocleada na infecção com *L. (L.) chagasi*. Embora, a

proposta do estudo tenha sido avaliar o potencial da CAMB como uma droga oral, acreditamos que devido a menor toxicidade em relação ao DAMB faz-se necessário também avaliarmos a atividade *in vivo* dessa formulação quando administrada por via intraperitoneal. Além disso, estes estudos podem contribuir para avaliarmos se a eficácia da CAMB no tratamento da LV experimental é dependente da via de administração.

Conclusões

CONCLUSÕES

- 1 Fica padronizada a técnica de infecção *in vitro* de macrófagos murinos com *L. (L.) chagasi*.
- 2 O efeito *in vitro* da associação de antimoniato de meglumina e desoxicolato de anfotericina B em modelos de infecção de macrófagos murinos com *L. (L.) chagasi* foi classificado como aditivo, ou seja, não houve interação entre as drogas.
- 3 A atividade *in vitro* anti-*Leishmania* da anfotericina B cocleada em modelos de infecção de macrófagos murinos com *L. (L.) chagasi* mostrou-se semelhante ao desoxicolato de anfotericina B com CI_{50/90} de 0,017/0,059 µg/mL e 0,021/0,090 µg/mL respectivamente.
- 4 Fica padronizada a técnica de infecção *in vivo* de macrófagos murinos com *L. (L.) chagasi*.
- 5 A anfotericina B cocleada apresentou menor toxicidade para macrófagos murinos em relação ao desoxicolato de anfotericina B.
- 6 Em modelos de infecção de camundongos com *L. (L.) chagasi* a anfotericina B cocleada não apresentou atividade quando administrada por via oral nas doses de 1 e 5 mg/kg/dia durante 15 dias, enquanto o desoxicolato de anfotericina B administrado por via intraperitoneal apresentou 100% de eficácia.

Referências

7 REFERÊNCIAS

ABRA R. M.; HUNT C. A. Liposome disposition in vivo. III. Dose and vesicle-size effects. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 666, n. 3, p. 493-503, Dec 23. 1981.

AGRAWAL S., RAI, M., SUNDAR S. Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective. **J. Postgrad. Med.**, v. 51, n. 1, p. 53-57, 1995.

BADARÓ, R. *et al.* A prospective study of Visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 639-649, 1986.

BADARÓ, R. *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, n. 1, p. 16-21, Jan. 1990.

BADARÓ, R. New perspective on subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.166, p. 1124-1132, 1986a.

BALEY, J. E. *et al.* Pharmacokinetics, outcome of treatment, and toxic effects of amphotericin B and 5-fluorocytosine in neonates. **J. Pediatr.**, v. 116, n. 5, p. 791-7, May 1990.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v. 13, n. 1, p. 238-52, Aug. 1965.

BARWICZ, J. *et al.* A kinetic study of the oxidation effects of amphotericin B on human low-density lipoproteins. **FEBS Letters.**, v. 465, p. 83-86. 2000.

BERMAN, J. D. *et al.* Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 30, n. 6, p. 847-851, Dec. 1986.

BERMAN, J. D., GALLALEE, J. V., BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty

acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, n. 2, p. 197-201, Jan 15. 1987.

BERMAN, J. D., WADDELL, D., HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, n. 27, v. 6, p. 916-920, June 1985.

BERMAN, J. D.; WYLER, D. J. An in vitro model for investigation of chemotherapy agent in leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 142, n. 1, p. 83-86, July 1980.

BOLARD, J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 864, p. 257-304, 1986.

BOVILL, J. G. Analysis of drug interactions. **Baillieres Clin. Anaesthes.** v. 12, n. 2, p. 153-168. June 1998.

BRAJTBURG, J. *et al.* Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. **Antimicrob. Agents and Chemother.** v. 34, p. 183-188. 1990.

BRAJTBURG, J., BOLARD J. carrier effects on biological activity of amphotericin B. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, n. 4, p. 512-531. Oct 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde.** 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde.** Controle, diagnóstico e tratamento da Leishmaniose Visceral (Calazar). Brasília, 1996.

BRYCESON, A. D. *et al.* Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. I. Clinical and immunological studies. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 5, p. 700-704, 1985a.

BRYCESON, A. D. *et al.* Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. II. Responsive to high dosagem sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 5, p. 705-714, 1985b.

BUFFET, P. A. *et al.* Culture Microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. 2167-2168, 1995.

BURGESS, J. L.; BIRCHALL, R. Nephrotoxicity of amphotericin B, with emphasis on changes in tubular function. **Am. J. Med.**, v. 57, p. 77-84, July 1972.

CAMARGO E. O. Growth and differentiation in trypanosoma cruzi; Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**, v. 12, p. 93-100, May-Jun 1964.

CARVALHO, S. F. G. **Associação de antimonial pentavelente e desoxicolato de anfotericina B no tratamento da leishmaniose visceral em crianças e adolescentes.** 2005. 125f. Dissertação (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

CARVALHO, S. F. G. **Utilização de baixas doses de desoxicolato de anfotericina B no tratamento da leishmaniose visceral em crianças e adolescentes.** 2000. 108f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

CHIA, J. K. S.; POLLACK, M. Amphotericin B induces tumor necrosis factor production by murine macrophages. **J. Infect. Dis.**, v. 159, n. 1, p. 113-116, Jan. 1989.

CHULAY, J. D.; SPENCER, H. C.; MUGAMBI, M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 4, p. 702-709, Jul. 1985.

CHUNGE, C. N.; GACHINI, G.; MUIGAI, R. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. III. Successful treatment using a combination of sodium stibogluconate plus allopurinol. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 715-718, 1985.

CORREIA, D. *et al.* Comparative study of meglumine antimoniate, pentamidine isethionate and aminosidine sulfate in the treatment of primary skin lesions caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 29, n. 5, p. 447 - 453, 1996.

CRAVEN, P. C.; GREMILLION, D. H. Risk factors of ventricular fibrillation during rapid amphotericin B infusion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 27, n. 5, p. 868-871, May 1985.

DAS, V. N. *et al.* A randomized clinical trial of low dosage combination of pentamidine and allopurinol in the treatment of antimony unresponsive cases of visceral leishmaniasis. **J. Assoc. Physicians India.**, v. 49, p. 609-613, 2001.

DE BEER, P. *et al.* A killing disease epidemic among displaced Sudanese population identified as visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.44, p.283-289, 1991.

DELMAS, G. *et al.* Efficacy of orally delivered cochleates containing amphotericin B in a murine model of aspergillosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2704-7, Aug. 2002.

DI CRISTINA, G. & CARONIA, G. Sulla terapia della leishmaniosi interna. **Pathologica**, v. 7, p. 82–83, 1915.

DIETZE, R. *et al.* Ensaio terapêutico com glucantime em saguis (*Callithrix jacchus*) infectados com uma cepa de *Leishmania donovani* aparentemente resistente ao tratamento. **Ver. Soc. Brás. Med.**, v. 18, n. 1, p. 39-42, 1985.

DI-MARTINO L. *et al.* Low dosage combination of meglumine antimoniate plus allopurinol as first choice treatment of infantile visceral leishmaniasis in Italy. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 5, p. 722, Sep-Oct 1990.

DRUTZ, D. J. Rapid infusion of amphotericin B: Is it safe, effective, and wise? **Am. J. Med.**, v. 93, p. 119-121, Aug. 1992.

EHRENFREUND-KLEINMAN, T. *et al.* Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B: arabinogalactan conjugates. **Biomaterials**, v. 23, n. 5, p. 1327-1335, 2002.

EVANS, G. T. *et al.* American visceral leishmaniasis (kala-azar). **West. J. Med.**, v. 142, p. 777-781, 1985.

EVANS, G. T. *et al.* Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v.166, p.1124-32, 1992.

FALK, R. *et al.* Distribution of amphotericin B-arabinogalactan conjugate in mouse tissue and its therapeutic efficacy against murine aspergillosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 9, p. 3606-9, Sep. 2004.

FAUST, E.C.; RUSSEL, P.F.; JUNG, R.C. **Parasitologia Clínica**. México: Ed. Salvat S.A., p. 888. 1974.

FIVELMAN, Q. L. *et al.* 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.** v. 48, n. 11, p. 4097-4102. Nov 2004.

FRANKE, E.D. *et al.* Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosa leishmaniasis. **Ann. Intern. Med.**, v. 113, p. 934-940, 1990.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, V. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, n. 2, p. 308-329, Mar./Apr. 1990.

GAMA, M.E.A. *et al.* Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p. 129-136, 2004.

GASSER JR, R. A. *et al.* Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 83-89, 1994.

GIGLIOTTI, F. *et al.* Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. **J. Infect. Dis.**, v. 156, n. 5, p. 784-789, Nov. 1987.

GIRI, O. P. Amphotericin B in visceral leishmaniasis. **Indian Pediatr.**, v. 30, n. 1, p. 74-78, Jan. 1993a.

GIRI, O. P. Amphotericin B therapy in kala-azar. **J. Indian Med. Assoc.**, v. 91, n. 4, p. 91-93, Apr. 1993b.

GRAYBILL, J. R. *et al.* Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B. **J. Infect. Dis.**, v. 145, n. 5, p. 748-752. May 1982.

GRAYBILL, J. R., BOCANERA R. Liposomal amphotericin B therapy of murine histoplasmosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 8, p. 1885-1887, Aug 1985.

GRUDA, I. *et al.* Application of differential spectra in the ultraviolet-visible region to study the formation of amphotericin B-sterol complexes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 602, n. 2, p. 260-8, 4 nov. 1980.

GUERIN, P. J. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 2, n. 8, p. 494-501. Aug 2002.

HERMANN, H.; GERCKEN, G. Metabolism of 1-O-[1'-14C]octadecyl-sn-glycerol in *Leishmania donovani* promastigotes: ether lipid synthesis and degradation of the ether bond. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.5, p.65-76, 1982.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-9, 2 oct. 1999.

HIEMENZ, J. W.; WALSH T. J. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, n. 2, p. 133-144, 1996.

HO, M. *et al.* Prevalence and disease spectrum in a new focus of visceral leishmaniasis in Kenya. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.76, p.741-746, 1982.

HOEPRICH, P. D. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique and fact. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, suppl 1, p.S114-9, 1992.

HOWARD, M. K. *et al.* Human urine stimulates growth of *Leishmania in vitro*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 477-479, 1991.

JHA, T. K. *et al.* Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 24, p. 1795-1800, 1999.

JHA, T. K. *et al.* Use of Amphotericin B in drug-resistant cases of visceral leishmaniasis in north Bihar, India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 6, p. 536-538, June 1995.

JOHNSON M. D., *et al.* Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. 693-715, Mar. 2004.

JULIANO R. L. *et al.* Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes. **Mol. Pharmacol.**, n. 31, v. 1, p. 1-11, Jan. 1987.

KEAN, B. H.; MOTT, K. E.; RUSSEL, A. Tropical medicine and parasitology. Classic Investigations. Ithaca and London: Cornell University Press, v. I, xxiii + p. 254-270, 1978.

KOTLER-BRAJTBURG, J. Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 15, p. 716, 1979.

KRISHNAN, S. *et al.* Drug-induced ventricular tachycardia in kala-azar. **J. Indian. Med. Assoc.**, v. 85, n. 2, p. 52-4, Feb.1987.

KUHLS, K. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes Infect.**, v. 9, n. 3, p. 334-43, Mar. 2007.

LEGRAND, P. *et al.* Release of amphotericin B from delivery systems and its action against fungal and mammalian cells. **J. Drug Target.**, v. 4, p. 311-319. 1997.

LOPEZ-BERESTEIN, G. *et al.* Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome-encapsulated amphotericin B. **J. Infect. Dis.**, v. 147, n. 5, p. 939-945, May 1983.

MAGALHÃES, P. A. *et al.* Calazar na zona do Rio Doce – Minas Gerais: Resultados das medidas profiláticas. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v. 22, n. 4, p. 197-202, 1980.

MANNINO R. J.; GOULD-FOGERTIE S. Lipid matrix-based vaccines for mucosal and systemic immunization. **Pharm. Biotechnol.**, v. 6, p. 363-387, 1995.

MCCURDY, D. K.; FREDERIC, M.; ELKINTON, J. R. Renal tubular acidosis due to amphotericin B. **N. Engl. J. Med.**, v. 278, n. 3, p. 124-131, Jan. 1968.

MISHRA, M. *et al.* Amphotericin B for second-line treatment of Indian kala-azar. **Lancet**, v. 337, n. 8746, p. 926, Apr. 1991.

MISHRA, M. *et al.* Amphotericin versus pentamidine in antimony – unresponsive kala-azar. **Lancet**, v. 340, p. 1256-1257, Nov. 1992.

MISHRA, M. *et al.* Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of indian kala-azar. **Lancet**, v. 344, p. 1599-1600, Dec. 1994.

MOREL, C. M. Neglected diseases: under-funded research and inadequate health interventions. **EMBO Rep.**, v. 4, n. 1, p. 35-38, June 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** v. 65, n. 1-2, p. 55-63. Dec 16. 1983.

MURRAY H. W. Progress in treatment of a neglected disease: visceral leishmaniasis. **Expert Rev. Anti Infect Ther.**, Estados Unidos, v. 2, p. 279 - 292, jun. 2004.

MURRAY, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 3, p. 359. Mar 2005.

NAVIN, T. R. *et al.* Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n.3, p. 528-34, 1992.

NEW, R. R.; CHANCE, M. L.; HEATH, S. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 8, n. 5, p. 371-81, Nov. 1981.

NICOLLE C. Nouvelles acquisition sur le Kala-azar culture; inovation auchien; etiologie – C. R. **Hedd. Scienes. et Acad. Sci.**, v. 146, p. 498-499, 1908.

NOVY F. G., MCNEAL W. J. The cultivation of Trypanossoma brucei: a preliminary note. **J. American. Med. Assoc.**, v. 41, p. 1266-1268, 1903.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J. of Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 1, 2003 (Editorial).

PAPAHADJOPOULOS, D. *et al.* Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 394, n. 3, p. 483-91, 3 July 1975.

PASTORINO, A. C. *et al.* Leishmaniose visceral na infância. Apresentação de 27 casos. **Revista Pediátrica de São Paulo**, v. 10, n. 4, p. 181-185, 1988.

PEARSON, R.D.; LAREAU, S.M.; JERONIMO, S.M. Leishmaniasis at the End of the Millennium. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v.1, n.5, p. 448-452, Dec. 1999.

PETIT, C. *et al.* Activity of a heat-induced reformulation of amphotericin B deoxycholate (fungizone) against *Leishmania donovani*. **Antimicrob. Agents Chemothe.**, v. 43, n. 2, p. 390-2, Feb. 1999.

POLLARD, H. B., BURNS, A. L., ROJAS, E. A molecular basis for synexin-driven, calcium-dependent membrane fusion. **J. Exp. Biol.**, v. 139, p. 267-286, 1988

PRATA, A. Treatment of kala-azar with amphotericin B. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p. 266-268, July 1963.

RAGUSA R. *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis with meglumine and allopurinol. **Am. J. Dis. Child.**, v. 6, n. 147, p. 611-612. Jun 1993.

RIJAL, S. *et al.* Sodium stibogluconate cardiotoxicity and safety of generics. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, v. 97, n. 5, p. 597-598. Sep-Oct 2003.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu. Ver. Microbiol.**, v.55, p. 453-483, 2001.

SALDANHA, A. C. A comparative study between sodium stibogluconate BP 88R and meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. I. The efficacy and safety. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 4, p. 383-7, July-Aug. 1999.

SANCHEZ-MIGALLON, M. P., ARANDA, F. J., GOMEZ-FERNANDEZ, J. C. Role of phosphatidylserine and diacylglycerol in fusion of chromaffin granules with target membranes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 314, p. 205-216, 1994.

SANTANGELO, R. *et al.* Efficacy of oral coxleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 9, p. 2356-60, Sep. 2000.

SEAMAN, J. *et al.* epidemic visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized trial of aminosidine plus sodium estibogluconate versus estibogluconate alone. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 715-720, 1993.

SEGARRA I.; MOVSHIN D. A.; ZARIF L. Pharmacokinetics and tissue distribution after intravenous administration of a single dose of amphotericin B cochleates, a new lipid-based delivery system. **J. Pharm. Sciences.**, v. 91, n. 8, p. 1827-1837, 2002.

SINGH, N. K. *et al.* Combination therapy in kala-azar. **J. Assoc. Physicians India.**, v. 43, n. 5, p. 319-320. May 1995.

SUNDAR S *et al.* A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 1, p. 139-143. Jul 1998c.

SUNDAR S. *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, Jan. 2002.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v.6, n.11, p.849, Nov. 2001b.

SUNDAR, S. *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis. **Méd. Microbiol. Immunol.**, v.190, n.1-2, p.89-92, 2001a.

TAYLOR R. L. Amphotericin B in liposomes: a novel therapy for histoplasmosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 125, n. 5, p. 610-611, May 1982.

THAKUR, C. P. Correlation of serum electrolyte imbalance prevents cardiac arrhythmia during amphotericin B administration. **Natl. Med. J. India.**, v. 8, p. 13-14, 1995a.

THAKUR, C. P. *et al.* Aminosidine plus sodium stibogluconate for the treatment of indian kala-azar: a randomized dose-finding clinical trial. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 219-223, Mar./Apr. 1995b.

THAKUR, C. P. *et al.* Amphotericin B in resistant Kala-azar in Bihar. **Natl. Med. J. India.**, v. 6, n. 2, p. 57-60, Mar/Apr 1993c.

THAKUR, C. P. *et al.* Are incremental doses of amphotericin B required for the treatment of visceral leishmaniasis? **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, n. 4, p. 365-370, 1994b.

THAKUR, C. P. *et al.* Daily versus alternate-day regimen of amphotericin B in the treatment of kala-azar: a randomized comparison. **Bull. World Health Organ.**, v. 72, n. 6, p. 931-936, 1994a.

THAKUR, C. P. *et al.* Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 92, n. 5, p. 561-569, 1998.

THAKUR, C. P. *et al.* Efficacy of amphotericin B in multi-drug resistant kala-azar in children in first decade of life. **Indian J. Pediatr.**, v. 60, n. 1, p. 29-36, 1993a.

THAKUR, C. P. *et al.* Evaluation of amphotericin B as a first line drug in comparison to sodium stibogluconate in the treatment of fresh cases of kala-azar. **Indian J. Med. Res.**, v. 97, p. 170-175, July 1993b.

THAKUR, C. P. Treatment of visceral leishmaniasis in Bihar. **Trop. Doct.**, v. 16, n. 4, p. 146-7, Oct. 1986.

THAKUR, C. P., KUMAR, M. Observations on the effect of verapamil with sodium stibogluconate in kala-azar. **Trop. Geogr. Med.**, v. 44, n. 1/2, p. 15-18, 1992.

TREMBLAY, C., *et al.* Efficacy of liposome-intercalated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 26, n. 2, p. 170-173, Aug 1984.

VERTUT-CROQUIN, A. *et al.* Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid

vesicles. A circular dichroism and permeability study. **Biochemistry**, v. 22, n. 12, p. 2939-44, 7 June 1983.

WASAN, K. M., LOPEZ-BERESTEIN, G. Diversity of lipid-based polyene formulations and their behavior in biological systems. **Euro. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 16, p. 81-92. 1997.

WHO - World Health Organization. **Control of the Leishmaniasis**. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, 1990. p. 158. (Thecnical Report Series, n. 793).

WHO - World Health Organization. **Dados epidemiológicos da leishmaniose visceral**. Disponível em <<http://www.who.int/whr/2002/en/>>. Acesso em: 2 out. 2007.

WHO - World Health Organization. **The World Health Report**. Geneva, 2002. p. 192-197. (Thecnical Report Series).

WILLIE S.; CUNNINGHAM M. L.; FAIRLAMB A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, Sep 17. 2004.

YAMEY, G.; TORREELE, E. The world's most neglected diseases. **British Medical Journal**, v. 325, n. 7357, p. 176-177, 27 July 2002. Erratum in *British Medical Journal*, v. 325, n.7360, p.352, 17 Aug. 2002.

YARDLEY, V. CROF, S. L. A comparison of the activities of tree amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v. 13, p. 243-248, 2000.

ZAGER, R. A.; BREDL, C. R.; SCHIMPF, B. A. Direct amphotericin B mediated tubular toxicity: assessments of selected cytoprotective agents. **Kidney Int.**, v. 41, n. 6, p. 1588-1594, June 1992.

ZARIF, L. *et al.* Antifungal activity of amphotericin B cochleates against *Candida albicans* infection in a mouse model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 6, p. 1463-9, June 2000.

ZARIF, L.; MANNINO, R. J. Cochleates. Lipid-based vehicles for gene delivery-concept, achievements and future development. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 465, p. 83-93, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)