



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO ITRACONAZOL E
RECOBERTAS COM MANOSE SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL
ESTUDO *IN VITRO***

LUBHANDWA SEBASTIAN BISWARO

**Brasília – DF
2016**

LUBHANDWA SEBASTIAN BISWARO

**EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO ITRACONAZOL E
RECOBERTAS COM MANOSE SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL
ESTUDO *IN VITRO***

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

**Brasília – DF
2016**

Biswaro, Sebastian Lubhandwa

Efeito das nanopartículas contendo itraconazol e recobertas com manose sobre leishmaniose visceral estudo *in vitro* – 2016

92f. Tese de Doutorado

Tese (doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Animal,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2016

1. Leishmaniose 2. Nanopartículas alvo ativo 3. Fármacos hidrofóbicos

I. Azevedo, Ricardo Bentes

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Joram e Justina Biswaro pelo seu apoio e amor ao longo de todos estes anos, aos meus irmãos; Biswaro, Mshama e Sanjura pela inspiração ao longo dos anos me empurrando para lutar por excelência...

Agradecimentos

Quero agradecer ao Prof. Dr. Ricardo por me dar a oportunidade de trabalhar sob sua supervisão, por ser meu orientador na pesquisa ajudando-me durante o desenvolvimento da minha tese e permitindo-me executar algumas ideias heterodoxas em relação ao meu trabalho, sempre me incentivando a tornar-me um pesquisador mais independente. Sentirei ainda saudades dos grandes churrascos promovidos pelo professor que sempre recebia seus alunos na sua casa com um bom humor.

Devo gratidão a Dra. Patricia Escobar por me auxiliar e contribuir com seu conhecimento, ajudando-me a desenvolver minhas habilidades de pesquisa ao longo dos anos do meu doutorado. Bem como, a sua vontade e paciência para estar sempre pronta em ajudar não só a mim, como também a outras pessoas.

Gostaria de agradecer também a Janaina Gomes Penteado pelo seu amor, carinho e apoio dentro e fora do laboratório, ajudando-me a desenvolver um caráter mais forte, Janaina sou grato por toda sua contribuição e ajuda durante a minha pesquisa.

Agradeço o apoio da Sra. Zelia Madeira por sua dedicação e competência em todos os momentos que precisei de materiais necessários para a realização de minhas experiências, sempre disposta em ajudar e fazia isso acompanhada com um ótimo sorriso.

Quero agradecer ao meu amigo irmão Rodrigo Morais por sua amizade e apoio, sempre pronto em ajudar-me, pelas brincadeiras sem fim durante minha estadia no Brasil. Agradeço também aos amigos que considero como irmãos os professores; Dr. Luis Muehlmann e Dr. João Paulo Longo por toda ajuda e por estarem ao meu lado nos bons e nos momentos difíceis que tive durante o meu doutoramento, tanto dentro como fora do laboratório. Permitindo-me que eu sempre podia contar com eles, pra mim isso foi muito importante.

Gostaria de agradecer a Paolin Caceres por sua amizade e apoio quando necessário, ao longo dos anos do meu doutorado. À Maria Luiza Fascinelli por seu apoio e vontade de me ajudar durante as experiências, também pela companhia de almoço no IBAMA.

À Karen Py Daniel, pelo seu apoio e amizade no laboratório auxiliando-me em algumas experiências, especialmente, nos testes que precisei usar o HPLC. Pelos momentos de conversa fora do Instituto por ser uma interminável fonte de ideias.

À Débora Santos pelo seu conhecimento em química e pelos argumentos filosóficos ao longo do tempo que tivemos no laboratório, a Luiza Lima por sua amizade e ajuda. Gostaria de agradecer também aos meus outros colegas de laboratório; Diego Iocca, Fred Horst, Mosar Correa, Raphael Bonadio, Rayane Ganassin pela amizade durante o meu doutorado, tanto dentro como fora do laboratório.

Gostaria de agradecer a Graziela e Daniela Moraes por terem sempre uma vibe positiva em qualquer tipo de circunstância.

A todos os professores e o pessoal que trabalha na administração do Programa de Pós-graduação em Biologia animal. À Profa. Carol, Profa. Fátima e Profa. Daniele, Kelly, Kesia e Sylvia obrigado por tudo!

A todos os professores do Departamento de Genética e Morfologia pelas sugestões e conselhos desde quando ingressei no doutorado. A todos os alunos de graduação e pós-graduação do Departamento de Genética e Morfologia pela generosidade desde quando cheguei ao laboratório muito obrigado!

Gostaria de agradecer a Deborah Santos para amizade e ajuda na correção de tese e formatação de trabalho. E gostaria de agradecer a Prof. Dra Monica Pereira Garcia para sua ajuda na correção da tese e incluindo todos as sugestões ,tempo e paciência na finalização de trabalho.

Aos órgãos financiadores CNPq, CAPES, FAPDF, FINATEC pelo financiamento da pesquisa e pela disponibilidade da bolsa de estudos.

Gostaria de agradecer a Universidade de Brasília para oportunidade de realizar meu doutorado.

“A educação não é uma maneira de escapar da pobreza, é uma maneira de combatê-la.”

JULIUS KAMBARAGE NYERERE

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por um protozoário leishmania e é transmitida por flebotomíneos. Esta doença acomete mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo. Os medicamentos de primeira linha utilizados para tratar esta doença foram os antimoniais, os quais possuem resistência e apresentam efeitos colaterais severos. O Itraconazol é um antimicótico que também é usado no tratamento de leishmaniose. No presente estudo, o Itraconazol foi encapsulado em nanopartículas utilizando o co-polímero láctico co-ácido glicólico (PLGA) e recobertas com manose. Estas nanopartículas foram caracterizadas e testadas em ensaios de citotoxicidade e atividade anti-leishmania. As nanopartículas de PLGA vazias apresentaram um diâmetro hidrodinâmico médio de $220 \text{ nm} \pm 27$ e um potencial zeta de $-1,1 \text{ mV} \pm 0,7$, enquanto nanopartículas de PLGA com itraconazol recobertas com manose (PLGA ITZ manose) apresentaram $263 \text{ nm} \pm 12,6$ e $-1,9 \text{ mV} \pm 0,5$. Por meio do ensaio de MTT, a citotoxicidade das nanopartículas vazias foi de 13,7% e 12,6% para as células THP-1 e J774, respectivamente, enquanto PLGA ITZ manose foram de 1% e 20,7% para as células THP-1 e J774, respectivamente. A análise da atividade anti-leishmaniose foi avaliada pela redução do número de células que continham mais de 20 amastigotas intracelulares e observou-se que PLGA ITZ manose a 0,1 mM e de PLGA ITZ a 0,2 mM reduziram o percentual de amastigotas intracelulares de 34,6% para $13,7 \% \pm 2,8$ e $5,7 \% \pm 2,1$ ($p < 0,05$), respectivamente, para *L (V.) panamensis*. Já para *L (L.) infantum*, a atividade leishmanicida de PLGA ITZ manose e nanopartículas de PLGA ITZ conseguiu reduzir os amastigotas de 16,7% para $4,8 \% \pm 2,8$ e $8,3 \% \pm 0,3$, respectivamente. Para *L (L.) braziliensis*, a atividade leishmanicida de PLGA e PLGA ITZ manose houve uma redução dos amastigotas com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) de 68,6% para $28 \pm 2,4\%$ e $21,1\% \pm 4,6$, respectivamente. As três cepas testadas responderam de forma diferente para as nanoformulações de PLGA contendo itraconazol com ou sem manose. As nanopartículas de PLGA carregadas com itraconazol revestidas com manose conseguiu reduzir mais amastigotas de *L (L.) infantum*, enquanto que nanopartículas de PLGA com itraconazol sem manose conseguiu reduzir mais amastigotas intracelulares de *L (V.) panamensis* e *L (L.) braziliensis*. O fato das nanopartículas de PLGA contendo itraconazol revestidas com manose terem apresentado uma maior eficácia na redução das formas amastigotas de *L (L.) infantum*, foi possivelmente devido à adição de manose a nanoformulação. Como recomendação

sugere-se que sejam realizados estudos *in vivo* das nanopartículas de itraconazol revestidas com manose para investigar e/ou confirmar o potencial dessas nanopartículas.

Palavras-chave: Leishmaniose, amastigotas, nanopartículas alvo ativo , fármacos hidrofóbicos

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease caused by the protozoa *Leishmania* and is transmitted by sand flies. This disease affects over 350 million people worldwide. The first-line drugs used to treat this disease were antimonials, which resistance and severe side effects have been associated with. Itraconazole is an antifungal which is also used in the treatment of leishmaniasis. In the present study, Itraconazole was encapsulated in nanoparticles using the copolymer lactic co-glycolic acid (PLGA) and coated with mannose. These nanoparticles were characterized and tested in cytotoxicity assays and anti-leishmania activity. The empty PLGA nanoparticles had a mean hydrodynamic diameter of $220 \text{ nm} \pm 27$ and a zeta potential of $-1.1 \text{ mV} \pm 0.7$, while PLGA nanoparticles coated with mannose itraconazole (ITZ mannose PLGA) were $263 \text{ nm} \pm 12$, 6 and $-1.9 \pm 0.5 \text{ mV}$. By means of the MTT assay, cytotoxicity of empty nanoparticles was 13.7% and 12.6% for THP-1 cells and J774, respectively, while PLGA ITZ mannose were 1% and 20.7% for the cells THP-1 and J774, respectively. The analysis of anti-leishmanial activity was evaluated by the reduction in the number of cells containing intracellular amastigotes more than 20 and it was noted that the PLGA ITZ 0.1 mM mannose and PLGA ITZ 0.2 mM reduced the percentage of intracellular amastigotes 34.6% to $13.7\% \pm 2.8$ and $5.7 \pm 2.1\%$ ($p < 0.05$), respectively, to *L (V.) panamensis*. As for *L (L.) infantum*, the leishmanicide activity of PLGA nanoparticles ITZ mannose and PLGA ITZ could reduce amastigotes from 16.7% to $4.8\% \pm 2.8$ and $8.3 \pm 0.3\%$, respectively. For *L (L.) braziliensis*, the anti-leishmanial activity of PLGA and PLGA ITZ mannose there was a reduction of amastigotes with statistically significant difference ($p < 0.05$) from 68.6% to $28 \pm 2.4\%$ and $21.1\% \pm 4.6$, respectively. The three strains tested responded differently to nanoformulation of PLGA containing itraconazole with and without mannose. The PLGA nanoparticles loaded with itraconazole coated with mannose could further reduce amastigotes *L (L.) infantum*, while PLGA nanoparticles with itraconazole without mannose could further reduce intracellular amastigotes *L (V.) panamensis*, and *L. (L.) braziliensis*. The fact that PLGA nanoparticles containing itraconazole coated with mannose have shown greater effectiveness in reducing amastigotes of *L (L.) infantum*, was possibly due to the addition of mannose to nanoformulação. As a recommendation is suggested that *in vivo* studies of itraconazole nanoparticles coated with mannose are carried out to investigate and / or confirm the potential of these nanoparticles.

Keywords: Leishmaniasis, amastigotes, active targeting nanoparticles, hydrophobic drugs

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de equipamentos utilizados.....	18
Tabela 2. Lista de materiais utilizados.....	19
Tabela 3. Lista de reagentes utilizados.....	19
Tabela 4. Caracterização de nanopartículas polimérica de PLGA com/sem Itraconazol ou manose mostrando seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI), Potencial Zeta e concentração de itraconazol (ITZ).....	25

LISTA DA FIGURAS

- Figura 1.** Epidemiologia Mundial da leishmaniose cutânea apresentando novos casos da doença relatados na Colômbia, Brasil, Peru e Irã no ano de 2013. **(Fonte:** Organização Mundial de Saúde (OMS), 2013). .2
- Figura 2.** Lesão de leishmaniose cutanea mostrando as bordas elevadas endurecidas com erosão central. **(Fonte:** Faber et al., 2012). 3
- Figura 3.** Epidemiologia mundial da leishmaniose visceral. Novos casos foram relatados no Brasil, no Sudão e na Índia em 2013. **(Fonte:**OMS, 2013)..... 4
- Figura 4.** Criança com hepatoesplenomegalia causada pelo leishmaniose visceral. **(Fonte** Soflaei et al,2012) 4
- Figura 5.** Ciclo de vida do parasita leishmania .A doença é transmitida a partir do vetor para um mamífero hospedeiro, o parasita existe em duas formas principais tanto promastigotas, estruturas alongadas ou como estruturas imóveis redondos chamadas de amastigotas. **(Fonte:** <CDC <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>). 7
- Figura 6.** Estrutura do itraconazol. Os três anéis de azóis podem ser observados a partir da estrutura química. Adaptado de PubChem.ncbi.nlm.nih.gov. Acessado em 15 dezembro 2015..... 9
- Figura 7.** Desenho esquemático do mecanismo de ação do itraconazol, mostrando o itraconazol inibindo α 14 dimetilase. Adaptado de doctorfungus.org/the drugs/antif-pharm.htm. Acessado em 12 de novembro 2015. 10
- Figura 8.** Nanopartículas poliméricas apresentando o polímero, o fármaco e tensoativo. **(Fonte:** Panyam et al., 2003). 11
- Figura 9.** Estrutura química do poli ésteres; ácido glicólico (PGA), ácido láctico (PLA) e poli(láctico-co-glicólico) (PLGA).**(Fonte** Srivastava *et al*,2013) 13
- Figura 10.** Receptor de manose mostrando os três domínios do receptor com afinidade para diferentes biomoléculas.**(Fonte** Pomares et al,2012) 15
- Figura 11.** Diâmetro Hidrodinâmico de nanopartículas de PLGA com ou sem itracinazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a 4 °C durante um período de 60 dias. 29
- Figura 12.** Potencial zeta de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a 4 °C durante um período de 60 dias..... 29
- Figura 13.** Diâmetro Hidrodinâmico de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a 37 °C durante um período de 60 dias..... 30

- Figura 14.** Potencial zeta de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a 37 °C durante um período de 60 dias..... 30
- Figura 15.** Diâmetro Hidrodinâmico de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a temperatura ambiente durante um período de 60 dias. 31
- Figura 16.** Potencial zeta de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a temperatura ambiente durante um período de 60 dias. 31
- Figura 17.** Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas poliméricas de PLGA vazias (a) e nanopartículas poliméricas de PLGA com itraconazol recobertas com manose (b)..... 32
- Figura 18.** Microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas poliméricas de PLGA vazias mostrando a superfície lisa e a não agregação das nanopartículas. Barra de escala de 100 nm. 33
- Figura 19.** Aglutinação da concanavalina A com nanopartículas ligadas a manose, indicando a aglutinação entre o manose e concanavalina A na NP PLGA ITZ manose. Na PLGA ITZ não houve aglutinação devido a ausência de manose..... 34
- Figura 20.** Curva analítica padrão da quantificação de manose em nanopartículas. As nanopartículas de PLGA contendo itraconazol recobertas com manose contêm 0,05 mM de manose. 34
- Figura 21.** Viabilidade celular de macrófagos humano (THP-1) e murino (J774) após 24 horas de exposição à nanopartículas poliméricas contendo diferentes concentrações de PLGA. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Sem diferenças estatísticas ($p > 0,05$)..... 35
- Figura 22.** Viabilidade celular de macrófagos humano (THP-1) e murino (J774) após 24 horas de exposição à nanopartículas poliméricas contendo diferentes concentrações de PLGA e recobertas com 0,05 mM de manose. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * estatisticamente significativo ($p < 0,01$)..... 36
- Figura 23.** Viabilidade celular de macrófagos humano (THP-1) após 24 horas de exposição às nanopartículas de PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose contendo diferentes concentrações de itraconazol (ITZ). Os dados são representados pela média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$)..... 37
- Figura 24.** Viabilidade celular de macrófagos murino (J774) após 24 horas de exposição às nanopartículas de PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose contendo diferentes concentrações de itraconazol (ITZ). Os dados são representados pela média \pm desvio padrão. * estatisticamente significativo ($p < 0,05$). 37
- Figura 25.** Efeito citotóxico da exposição, por 24 horas, de diferentes concentrações de itraconazol em macrófagos humano (THP-1) e murino (J774). Os dados são representados pela média \pm desvio padrão. * estatisticamente significativo ($p < 0,01$). 38
- Figura 26.** Percentual de inibição do crescimento de promastigotas do *Leishmania (V.) infantum* quando expostos por 72 horas a 28 °C à itraconazol livre, nanopartículas poliméricas de PLGA com ITZ e PLGA

com ITZ recobertas com manose, em diferentes concentrações do fármaco. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** diferença estatística de $p < 0,001$ 39

Figura 27. Percentual da inibição do crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* quando expostos por 72 horas a 28 °C às nanopartículas poliméricas com diferentes concentrações PLGA e recobertas com 0,05 mM de manose, sem fármaco . Os dados representam a média \pm desvio padrão. 40

Figura 28. Percentual de inibição do crescimento de amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (A) após exposição por 48 horas a diferentes concentrações de itraconazol presentes em nanopartículas de PLGA ITZ (PI) e PLGA ITZ Manose (PIM). As nanopartículas de PLGA ITZ apresentaram maior inibição em comparação com nanopartículas de PLGA ITZ manose a 0,03 mM (5% contra 2%), mas PLGA ITZ Manose apresentou maior inibição a 2,2 mM de 11,4% em comparação com 4,4% de NPs PLGA ITZ . *Leishmania (V.) braziliensis* (B) As nanopartículas de PLGA ITZ manose apresentaram maior inibição em comparação com nanopartículas de PLGA ITZ sem manose a 0,1 mM de 20% em comparação com 9%, enquanto a 2,2 mM as NP PIM mostraram uma inibição estatisticamente maior ($p < 0,001$) de 57% em comparação com 18% apresentado pelas nanopartículas contendo o itraconazol sem manose. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$)..... 41

Figura 29. Percentual de inibição de amastigotas após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de itraconazol livre. O fármaco apresentou melhor eficácia contra amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* do que *Leishmania (V.) braziliensis*. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$). 42

Figura 30. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol e recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM, 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,1 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares. 43

Figura 31. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania (V.) braziliensis* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM; 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$)..... 44

Figura 32. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM, 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,2 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares. 45

Figura 33. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania (V.) braziliensis* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM; 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$). 46

Figura 34. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol e recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM, 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,1 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares.47

Figura 35. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania (L.) infantum* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM; 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. Os dados representam a média ± desvio padrão. * estatisticamente significativo ($P < 0,05$) e *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$). ..48

Figura 36. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM, 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,2 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares.49

Figura 37. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania (L.) infantum* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM; 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. Os dados representam a média ± desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).50

Figura 38. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania panamensis* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol e recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM, 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,1 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares.51

Figura 39. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania panamensis* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM; 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. Os dados representam a média ± desvio padrão. * estatisticamente significativo ($P < 0,05$) e ** estatisticamente significativo ($p < 0,01$).52

Figura 40. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania panamensis* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM, 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,2 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares.53

Figura 41. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania panamensis* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, representam a média ± desvio padrão. ** estatisticamente significativo ($P < 0,01$) e *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).54

LISTA DE ABREVIATURAS

°C- Graus Celsius

ConA- Conconavalina A

EDA-Etilenodiamina

DCC - N • 3-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida

DMSO - Dietílsulfóxido

FDA -Food and Drug Administration

ITZ - Itraconazol

J774 - Linha celular de macrófagos murina

MET -Microscopia eletrônica de transmissão

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

mL- mililitro

mM - MilliMolar

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

mV- millivolts

µL- microlitro

NHS - N-hidroxi succinimida

nM - nanomolar

NP PLGA ITZ Mannose- Nanopartículas de PLGA contendo Itraconazol coberto com manose

nm- nanomêtro

OMS- Organização Mundial de Saude

PLGA - Co-polímero ácido Poli lático-glicólico

PVA- álcool polivinil

PEG - Polietileno glicol

PMA - Miristato acetato de forbol

PBS-Tampão fosfato(do Inglês,Phosphate Buffer Saline)

RPMI -Meio de cultura -Instituto Roswell Park Memorial

RRP- Receptor de reconhecimento de padrões

SFB -Soro fetal de bovino

SMF- Sistema mononuclear fagocitário

TFA- ácido trifluoroacético

THP-1- Linha celular monocítica humana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmaniose cutânea.....	2
1.2. Leishmaniose visceral.....	3
1.3. Ciclo de vida do parasita	5
1.4 Tratamento	7
1.5 O itraconazol	9
1.6 O mecanismo de ação de itraconazol	10
1.7 Nanopartículas	11
1.8 Sistemas de entrega drogas	12
1.9. Modificação de propriedades de superfície	13
1.10 O receptor de manose	15
1.11 Justificativa.....	16
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. Metodologia.....	18
3.1. Materiais	18
3.2. Métodos	19
3.2.1. Preparação das nanopartículas	19
3.2.2. Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC.....	20
3.2.3. Adsorção de Mannose	21
3.2.4. Caracterização coloidal e estabilidade.....	21
3.2.5. Análise por microscopia eletrônica	21
3.2.6. Ensaio de quantificação de manose em nanopartículas.....	22
3.2.7. Ensaio de aglutinação de nanopartículas com manose	22
3.2.8 Cultivo de células de mamíferos.....	22
3.2.9. Ensaios de toxicidade das diferentes nanopartículas sobre células de mamíferos.....	24
3.2.10. Ensaios Anti-leishmania	25
3.2.11. Análise estatística	27
4. Resultados.....	28

4.1	Caracterização das nanopartículas	28
4.1.1	Propriedades coloidais das nanopartículas	28
4.1.2	Estabilidade das nanopartículas em condições diferentes.....	28
4.1.3	Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão	32
4.1.4	Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	32
4.2	Determinação da presença e quantificação de manose em nanopartículas.....	33
4.3	Viabilidade celular dos macrófagos	35
4.4	Atividade anti-leishmania de nanopartículas de PLGA, PLGA Manose, PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose contra promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> e amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> e <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	38
4.4.1	Atividade anti-leishmania de itraconazol encapsulado ou livre contra promastigotas.....	38
4.4.2	Atividade anti-leishmania <i>in vitro</i> contra amastigotas.....	40
5	Discussão.....	55
6	Conclusão.....	61
7	Referências.....	62

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença provocada por protozoários e é transferida entre os hospedeiros mamíferos utilizando *flebotomos* como vetores. No Novo Mundo, o vetor pertence ao gênero *Lutzomyia* enquanto que no Velho Mundo, ao gênero *Phlebotomus* (Lane *et al.*, 2003). O padrão de propagação da doença mudou ao longo do tempo (Kevric *et al.*, 2015). Foi historicamente limitada as regiões tropicais e subtropicais, espalhando-se também para outras regiões não endêmicas, devido ao aumento da migração humana, do reassentamento e também porque o vetor (mosquito) pode transmitir a doença entre mamíferos, por exemplo de cães para os humanos (Desjeux, 2001). Além disso, o número de casos de pessoas infectadas com a doença tem aumentado devido à co-infecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GUERRERO *et al.*, 1987 ; BARRAGÁN *et al.*, 2010).

A doença é encontrada em quase todos os continentes, com exceções na Austrália e na Antártica (Kalter, 1989), é predominante em duas formas principais; cutânea e visceral. Outras formas incluem: mucosa, cutânea difusa, leishmaniose recidiva e leishmaniose dérmica pós-calazar (Polonio *et al.*, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a prevalência dos casos de leishmaniose visceral é relatada nos países Sudão e Índia, enquanto a leishmaniose cutânea é mais prevalente no Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Peru e Brasil. Outros países afetados pela doença incluem: Colômbia, Etiópia, Quênia, França, Itália, Grécia, Malta , Espanha e Portugal (OMS, 2013). A leishmaniose é estimada como a nona maior doença infecciosa e ainda continua sendo negligenciada.

Em relação às espécies de *Leishmania*, atualmente existem 30 espécies conhecidas das quais 21 são causadoras de doenças que podem infectar mamíferos. Isso inclui o complexo *Leishmania donovani* com duas espécies: *L. donovani* e *L. infantum*; e o complexo *Leishmania mexicana*, que abrange quatro espécies: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* e *L. tropica*. Estes parasitas são morfologicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciados por análise isoenzimática e análise de sequências de DNA (McCONVILLE *et al.*, 2011).

1.1. Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença. Conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (**Figura 1**), há uma maior concentração do número de casos da doença no Oriente Médio, na Ásia, Norte da África e Sul da Europa, América do Sul e América Central (OMS, 2013).

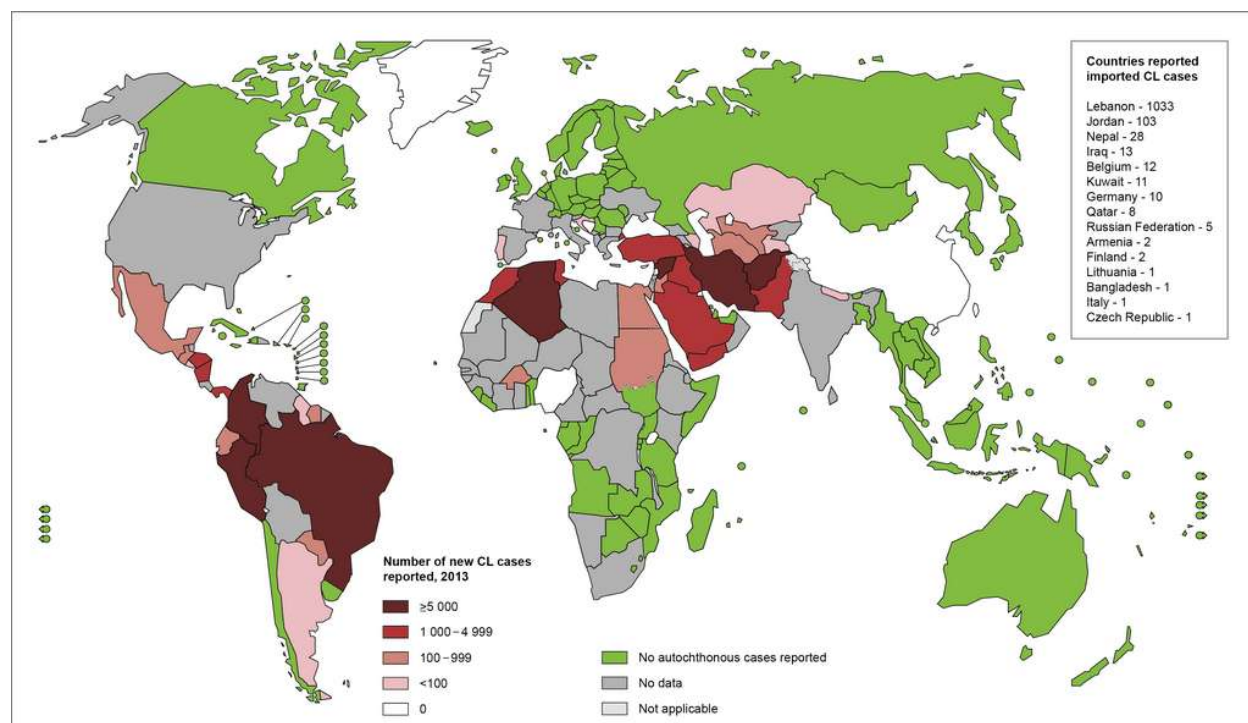


Figura 1. Epidemiologia Mundial da leishmaniose cutânea apresentando novos casos da doença relatados na Colômbia, Brasil, Peru e Irã no ano de 2013. (**Fonte:** Organização Mundial de Saúde (OMS), 2013).

Após a picada do mosquito transmissor da doença, o indivíduo só começa a desenvolver a leishmaniose cutânea após semanas chegando a meses, até que sejam manifestadas as lesões na pele. Normalmente, metade das pessoas infectadas apresentam lesões em partes visíveis na cabeça, mãos e braços (Faber *et al.*, 2012). Essas lesões dão origem às úlceras que contêm bordas elevadas endurecidas com erosão central que podem ser cobertas com uma crosta (**Figura 2**). Se estas úlceras aparecem nas articulações podem tornar-se dolorosas. Geralmente estas úlceras podem aparentemente aparecer “curadas” espontaneamente durante um período de meses, apresentando cicatrizes cribriformes com auréola hiper-pigmentadas. O parasita, ainda assim,

pode persistir nas cicatrizes fechadas e reaparecem quando a pessoa tem imunossupressão (BOGDAN *et al.*, 2012).



Figura 2. Lesão de leishmaniose cutanea mostrando as bordas elevadas endurecidas com erosão central. (Fonte: Faber *et al.*, 2012).

1.2. Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é também conhecida como calazar, causa 500.000 novos casos anualmente segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). A doença está fortemente ligada a situações de pobreza e 90% dos casos ocorrem nas áreas mais pobres de Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (Horst *et al.*, 2008; OMS, 2013). A leishmaniose visceral é letal se não tratada e também é listada pela OMS como uma das principais doenças infecciosas mais importantes com alta capacidade de causar epidemias em larga escala (DESJEUX, 2004).

A leishmaniose visceral é causada pelo complexo *Leishmania donovani*. A forma zoonótica, em que os cães são os principais carregadores do patógeno, é presente na bacia do Mediterrâneo, China, Oriente Médio e América do Sul (Figura 3) e se disseminam em dois tipos: *Leishmania infantum* ou *Leishmania viania infantum* (Van de Ven *et al.*, 2011). A forma antroponótica, na qual o homem funciona como reservatório do patógeno, é provocado por *Leishmania donovani* e é predominante na África Oriental e subcontinente indiano.

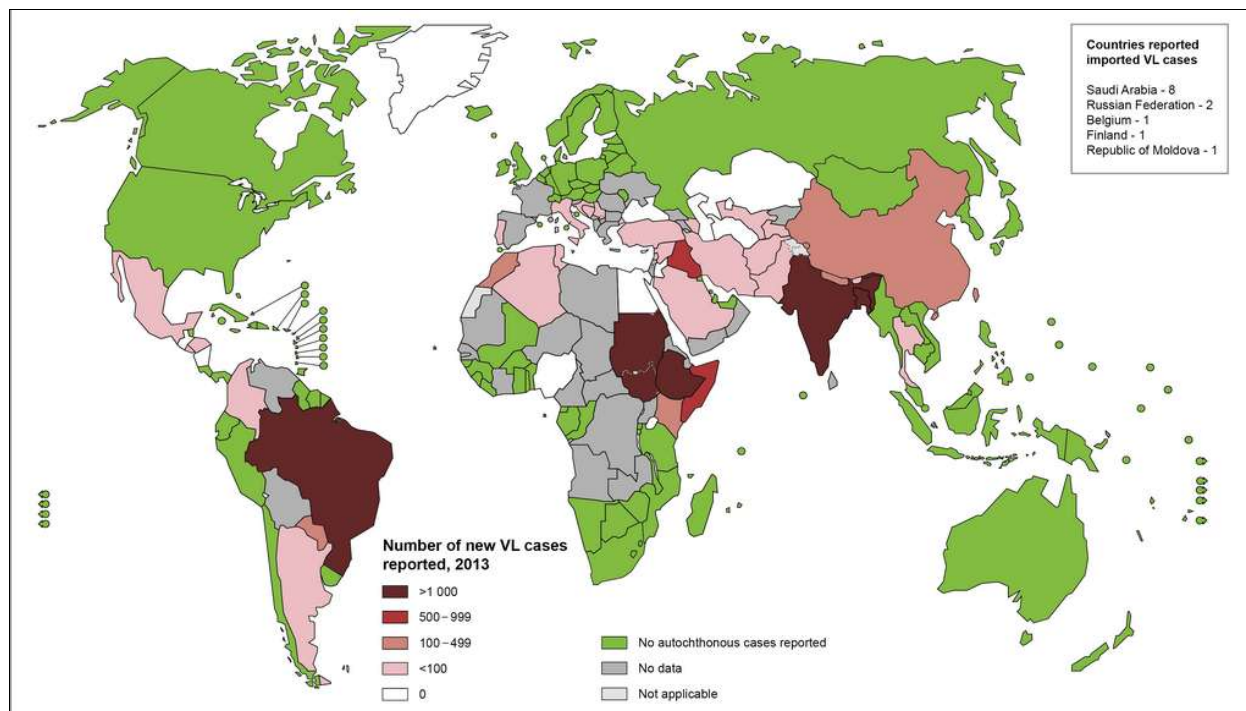


Figura 3. Epidemiologia mundial da leishmaniose visceral. Novos casos foram relatados no Brasil, no Sudão e na Índia em 2013. (Fonte OMS, 2013).

Está doença normalmente leva meses ou anos para se desenvolver após a inoculação (Kansal *et al.*, 2012) e é caracterizada por febre, fraqueza, tosse, diarreia, perda de peso significativa, anorexia, palidez, epistaxe, hepatoesplenomegalia (**Figura 4**), linfadenopatia e atraso de crescimento em crianças. O nome “doença negra”, também adotada para a leishmaniose visceral, vem do fato de que observa-se uma hiperpigmentação significativa em pacientes com a doença. No diagnóstico laboratorial, anomalias tais como: anemia normocítica, trombocitopenia, neutropenia, transaminite, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia são observadas. Se a doença não for tratada dentro de dois anos, resulta em morte por anemia grave e hemorragia (MALTEZOU *et al.*, 2000; SOFLAEI *et al.*, 2012).



Figura 4. Criança com hepatoesplenomegalia causada pelo leishmaniose visceral. (Fonte Soflaei et al, 2012)

1.3. Ciclo de vida do parasita

A doença é transmitida por um mosquito vetor que ingere o sangue de uma pessoa ou animal infectado com o protozoário. A doença pode manifestar-se em cães, raposas, roedores como hamster, ratos e hiracóides (Deane *et al.*, 1962). Tanto humanos como animais podem não desenvolver a doença e servir apenas como reservatório do protozoário (DESJEUX, 2004). O parasita *leishmania* é um protozoário digenético. Ele existe no hospedeiro vetor (mosquito) como um parasita extracelular, alongado, flagelado conhecido como *promastigotas*. No hospedeiro mamífero, vive como um parasita intracelular, de formato arredondado, sem locomoção conhecido como *amastigotas* (GIUDICE *et al.*, 2007).

Quando os amastigotas são ingeridos e chegam ao intestino do mosquito, eles se transformam em promastigotas. Os promastigotas migram para o intestino médio do mosquito, onde vivem como microorganismos extracelulares livres, se multiplicando por divisão binária. Depois de cinco dias de desenvolvimento dentro do inseto, migram para o esôfago, e depois para as glândulas salivares do hospedeiro vetor. Quando o inseto pica o hospedeiro mamífero, ele cria uma lesão pequena que a saliva contendo anticoagulante (para evitar a coagulação do sangue) deixa o ferido aberto, quando então os promastigotas atravessam a pele e passam para a corrente sanguínea, onde são fagocitados pelos macrófagos e se transformam em amastigotas (LANE *et al.*, 2003).

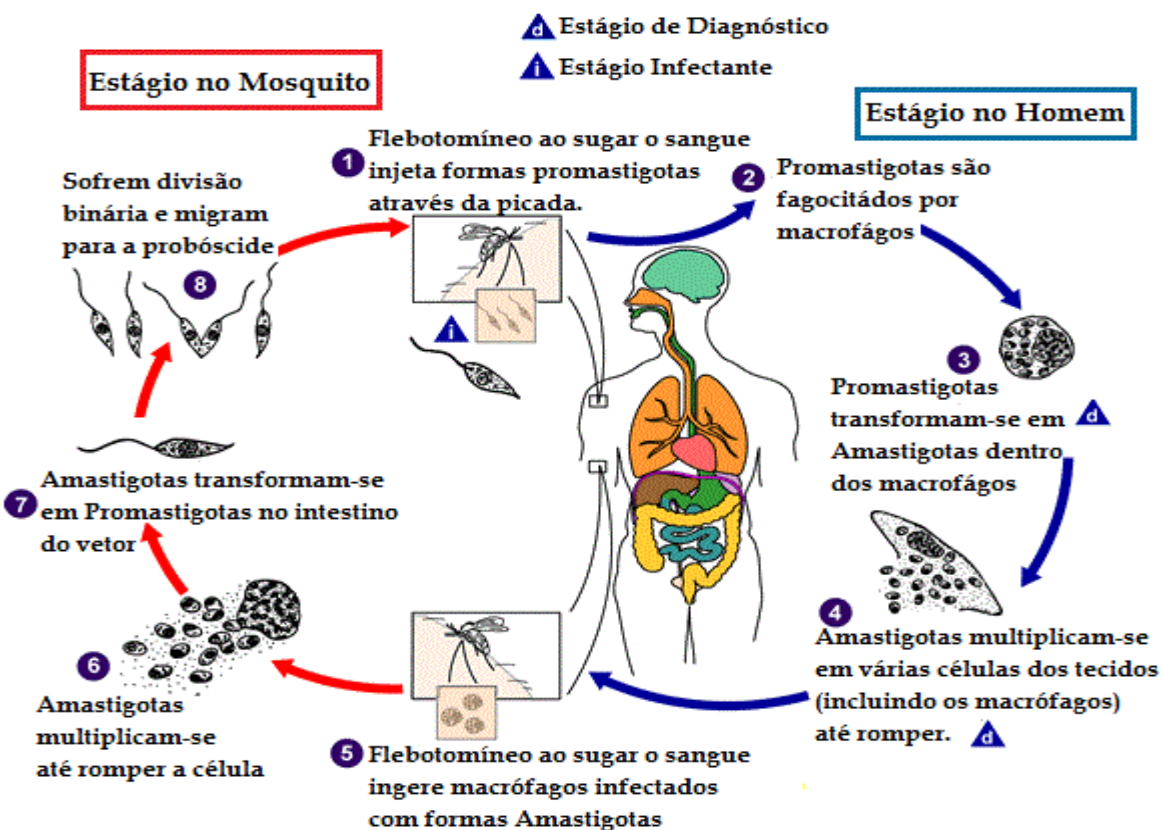
O parasita sobrevive dentro dos macrófagos, resistindo às hidrolases e outros microbicidas e assim, continuando a se multiplicar, levando finalmente à lise das células, e liberando amastigotas que invadem outros órgãos contendo macrófagos (Lane *et al.*, 2003). Além disso, os promastigotas metacíclicos não se limitam a macrófagos, como também de invasão de outros tipos de células, tais como os neutrófilos e as células dendríticas. E quando diferenciados para os amastigotas eles se replicam dentro dos compartimentos como lisossomos também conhecidos como vacúolos parasitóforos (McCONVILLE *et al.*, 2011).

Dentro dos vacúolos parasitóforos os amastigotas proliferam rapidamente nas primeiras semanas, para evitar o desenvolvimento da imunidade adquirida. A imunidade adquirida depende de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e dos perfis de citocinas liberadas pelos T auxiliares tipo (Th1).

Quando citocinas pró-inflamatórias, tais como o interferon gama (IFN- γ), interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral (TNF) são liberadas ativam a indução da síntese do óxido nítrico (iNOS) enzima está responsável pela oxidação dos átomos de nitrogênio terminais da guanidina e L-arginina, esta enzima produz óxido nítrico nas células infectadas, resultando na redução dos amastigotas (McCONVILLE *et al.*, 2011).

No entanto, em alguns casos, a indução de T auxiliares tipo 2 (Th2), citocinas (IL-12, IL-3) e/ou produção de IL-10 podem levar ao desenvolvimento da doença e não reduzir a parasitemia. Isso implica que o parasita consegue persistir em tecidos múltiplos, mesmo depois que o sistema imunitário atue para prevenir o desenvolvimento da doença ou após a aplicação de tratamentos convencionais para combater a doença. Parasitas persistentes podem fornecer imunidade para re-infecção em seres humanos e animais, mas também tornar-se uma fonte de recrudescência se o mecanismo de células T falhar, como no caso de pacientes com HIV (Sacks *et al.*, 2004). Depois que os amastigotas são captados pelo mosquito, e este sugar o sangue do hospedeiro infectado, os amastigotas se transformam em promastigotas e o ciclo continua (**Figura 5**).

Leishmania Visceral



<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Figura 5. Ciclo de vida do parasita leishmania .A doença é transmitida a partir do vetor para um mamífero hospedeiro, o parasita existe em duas formas principais tanto promastigotas, estruturas alongadas ou como estruturas imóveis redondas chamadas de amastigotas. **Fonte:** <CDC <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>.

1.4 Tratamento

A leishmaniose é tratada principalmente por quimioterapia, embora outras formas sejam usadas como: crioterapia, termoterapia, terapia fotodinâmica (El-On, J *et al.*, 2004) e aplicação tópica convencional. A quimioterapia de leishmaniose envolve o uso de estibogluconato de sódio, como uma primeira linha de drogas. A mesma tem sido usada desde 1935 e é um antimônio pentavalente utilizado para o tratamento de leishmaniose cutânea e visceral. No entanto, a droga exige um longo tratamento e em alguns casos pode causar resistência, como em

casos que tem sido relatado no estado de Bihar na Índia, onde foi observada uma resistência de 60% em pacientes tratados com a droga (TDR, 2002). Por esse motivo, outros fármacos também são aplicados para combater a doença.

A segunda linha de drogas envolve a anfotericina B, que demonstrou alta potência leishmanicida. No entanto, o fármaco apresenta efeitos colaterais graves (Thakur, 1999). A fim de resolver o problema de toxicidade da anfotericina B, nanoformulação de lipossoma são desenvolvidas. A Ambisome, nome comercial da anfotericina B lipossomal, apresenta maior eficácia e menor toxicidade, mas tem como desvantagem principalmente o custo, especialmente em países endêmicos em desenvolvimento (SUNDAR *et al.*, 2003; MANANDHAR *et al.*, 2008).

Alternativamente, outro fármaco administrado por via oral para a leishmaniose visceral é a miltefosina, que tem sido útil contra a doença em pacientes resistentes aos antimoniais (Sundar *et al.*, 2000). A miltefosina foi desenvolvida e aprovada como uma droga anti-câncer, e posteriormente, para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana na Colômbia em 2005. No entanto, este fármaco tem levantado preocupações sobre o seu potencial de teratogenicidade e resistência a longo prazo (BRYCESON *et al.*, 2001; GODINHO *et al.*, 2012).

Outro medicamento para o tratamento de leishmaniose é a paromomicina (Soto *et al.*, 2002), um antibiótico aminoglicósido, identificado em 1960 como um agente leishmanicida que pode ser aplicado por via intramuscular ou por via tópica. A paromomicina tem mostrado resultados variados de eficácia. Em ensaios clínicos na Índia, tem revelado uma taxa de cura de 95% dos pacientes com leishmaniose visceral. Na América do Sul uma pomada contendo 15% paromomicina e 12% de cloreto de benzecônio (agente de penetração da pele) demonstrou uma taxa de cura de 77% em pacientes infectados por *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania mexicana* (El On *et al.*, 1984; Arana *et al.*, 2001). No entanto, causa irritação cutânea grave, devido à ação do cloreto de benzecônio, dessa forma seu uso é limitado durante o tratamento. A OMS adaptou uma formulação de 15% de paromomicina com 10% de ureia que provou ser ineficaz em ensaios clínicos conduzidos na Tunísia e Irã (ASILIAN *et al.*, 1995; SALAH *et al.*, 2000; BAVARSAD *et al.*, 2012).

Outros antifúngicos também tem sido testados, principalmente os da classe dos azóis, como o cetoconazol (Vannier-Santos *et al.*, 1995), o clotrimazol e o miconazol (Larbi *et al.*, 1995), Baroni *et al.*, 2009) além da terbinafina e itraconazol (Dogra & Saxena, 1996), sendo que

estes dois últimos têm mostrado capacidade para suprimir o crescimento de promastigotas e amastigotas *in vitro*. Em ensaios clínicos envolvendo itraconazol, uma taxa de cura de 70% foi observada para *Leishmania tropica* e 59% em promastigotas de *Leishmania major*, conforme estudos publicados por Momeni *et al.*, (1996) e Nassiri *et al.*, (2005).

1.5 O itraconazol

O itraconazol é um composto de triazol, que ataca um largo espectro de fungos. O itraconazol é uma mistura racêmica 1:1:1:1 de quatro diastereoisômeros (dois pares enantiômeros), cada um possuindo três centros quirais (**Figura 6**). Apresenta fórmula molecular de $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$ e massa molecular de 705,64 u. É um pó branco ligeiramente amarelado, insolúvel em água, ligeiramente solúvel nos álcoois e altamente solúvel em solução orgânica (CHEN *et al.*, 2008).

Em investigações citadas na literatura, o itraconazol apresentou espectro mais amplo de atividade contra leveduras, rhizopus e dermatófitos que outros azóis (DeBeule, 1995; Willems *et al.*, 2001). Por exemplo, fungos como *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces* são bastante sensíveis ao Itraconazol (FROMTLING *et al.*, 1987; MANGINO & PAPPAS, 1995; DORSTHORST *et al.*, 2013).

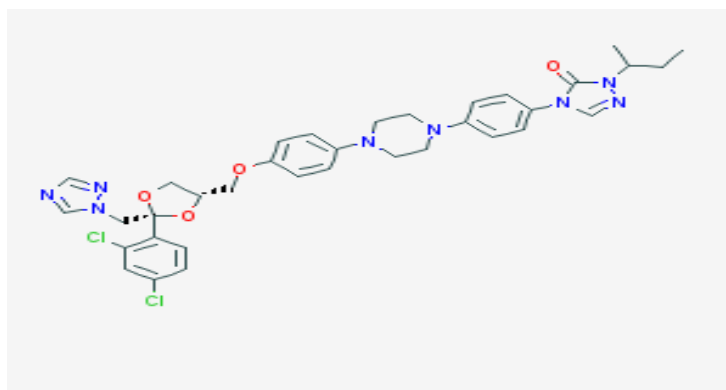


Figura 6. Estrutura do itraconazol. Os três anéis de azóis podem ser observados a partir da estrutura química. Adaptado de PubChem.ncbi.nlm.nih.gov. Acessado em 15 dezembro 2015.

1.6 O mecanismo de ação de itraconazol

O composto funciona através da interferência da desmetilação do lanosterol para ergosterol pela enzima 14-dimetilase, que são os principais componentes da membrana celular fúngica. A inativação desta enzima leva a um acúmulo de 14-metilesterol. Como o lanosterol simultaneamente reduz a quantidade de ergosterol, este por sua vez, leva a diminuição da síntese da membrana e perda da estabilidade celular dos fungos (DEBEULE, 1995; POMEL *et al.*, 2015).

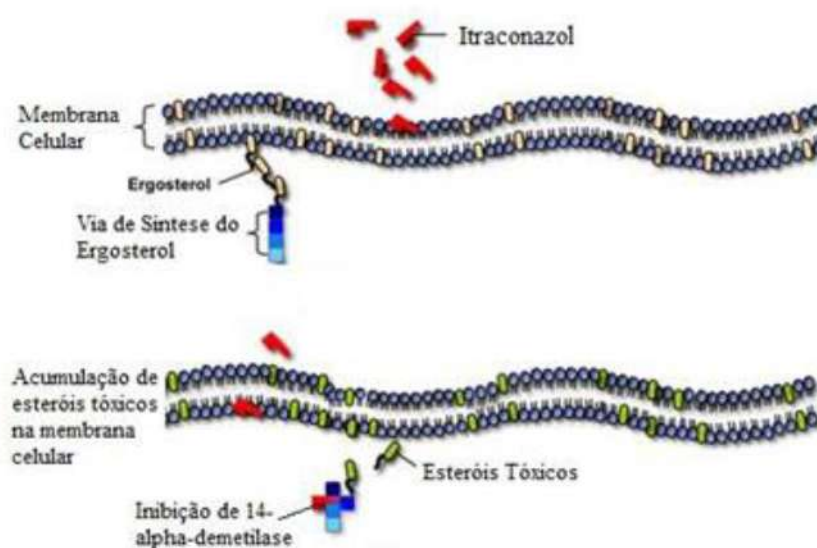


Figura 7. Desenho esquemático do mecanismo de ação do itraconazol, mostrando o itraconazol inibindo a 14-dimetilase. Adaptado de [doctorfungus.org/the drugs/antif-pharm.htm](http://doctorfungus.org/the-drugs/antif-pharm.htm). Acessado em 12 de novembro 2015.

1.7 Nanopartículas

Nanopartículas são geralmente definidas como partículas que variam em tamanho entre 10 a 1000 nm (Rao *et al.*, 2011). As nanopartículas podem ser utilizadas como veículo para um fármaco de interesse por meio de encapsulação, aprisionamento ou adsorção (Muthu *et al.*, 2009). Devido ao pequeno tamanho das nanopartículas, os fármacos podem ser entregues a regiões consideradas de difícil acesso, como por exemplo, o sistema nervoso central que está protegido pela barreira hemato-encefálica (CZERNIAWSKA *et al.*, 1970; CHEN *et al.*, 2012).

As propriedades das nanopartículas variam principalmente em sua composição, estrutura e características de superfície. Existem vários tipos de nanopartículas, elas podem ser lipossomas, micelas, dendrímeros, nanoesferas, nanocápsulas, entre outras (FARAJI *et al.*, 2009).

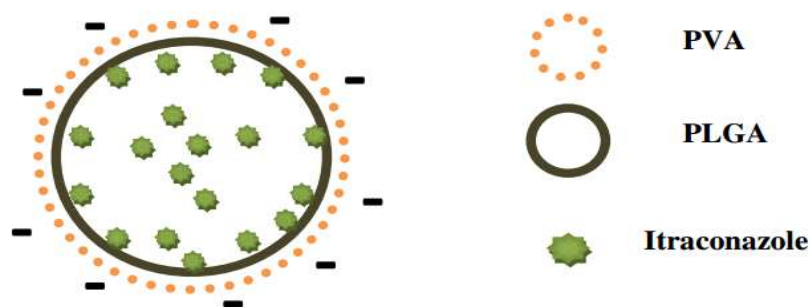


Figura 8. Nanopartículas poliméricas apresentando o polímero, o fármaco e tensoativo. (Fonte: Panyam et al., 2003).

1.8 Sistemas de entrega drogas

Sistemas de entrega de drogas consistem em sistemas de liberação de um fármaco desejado em um sítio alvo. Com o advento da nanotecnologia uma grande variedade de estratégias de distribuição de drogas tem sido explorada (ALLEMAN *et al.*, 1993; HUGHES, 2005).

Os lipossomas são vesículas esféricas que consistem de uma ou mais bicamada fosfolipídica em torno de um espaço contendo água (Drulis-Kawa *et al.*, 2010). Os lipossomas são utilizados como sistema de entrega de droga, porque se assemelham a membrana da célula, pela estrutura e composição (Haley & Frenkel, 2008). Um dos primeiros medicamentos preparados na forma de lipossoma foi para o tratamento de câncer usando doxorubicina (ALLEN *et al.*, 2004; KHATRY *et al.*, 2010).

Na literatura há diversos estudos com lipossomas para liberação de drogas, um exemplo é o uso da anfotericina B lipossomal, conhecida como Ambisome (Janknegt *et al.*, 1992). A vantagem de usar os lipossomas incluem baixa toxicidade (Weyhers *et al.*, 2006), são facilmente biodegradáveis e formam produtos não tóxicos (Muller & Olbrich, 1999), além de possuir capacidade de incorporar fármacos lipofílicos e hidrofílicos (Muller *et al.*, 2002).

Contudo, algumas desvantagens estão associadas aos lipossomas, estas limitações incluem a baixa eficiência de encapsulação, o vazamento rápido de fármaco solúvel em água a partir do núcleo, a baixa estabilidade, bem como a baixa capacidade de liberar uma variedade de fármacos (LABHASETWAR *et al.*, 1997; COUVREUR *et al.*, 1979; SPEISER & BIRRENBACH, 1977; MARTY *et al.*, 1978; SPEISER, 1973; KREUTER, 1978, KUMARI *et al.*, 2010).

Tendo em vista as limitações em relação ao uso dos lipossomas, outros tipos de nanopartículas são investigados, tais como as nanopartículas poliméricas. As nanopartículas poliméricas biodegradáveis possuem inúmeras vantagens sobre os sistemas lipossomais, elas são mais estáveis e capazes de atuar em liberação controlada de fármacos. Além disso, em comparação com os seus homólogos, nanopartículas poliméricas possuem alta capacidade de carregar droga, aumentando a entrega intracelular (PINTO *et al.*, 2006).

Uma das nanopartículas poliméricas mais utilizadas são as sintetizadas a partir do copolímero ácido Polilático-glicólico (PLGA) (**Figura 9**), um poli éster biodegradável que foi aplicado em vários sistemas de entrega de drogas (Panyam *et al.*, 2003; Jain R, 2000). O polímero possui uma excelente biocompatibilidade (STEVANOVIĆ *et al.*, 2007).

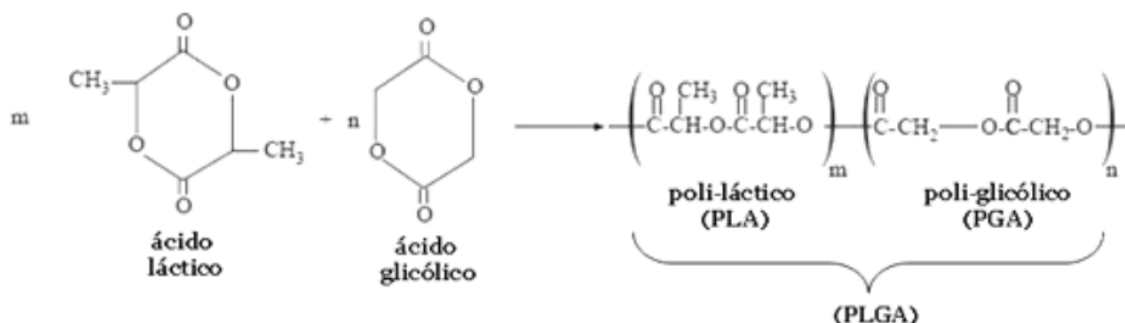


Figura 9. Estrutura química do poli ésteres; ácido glicólico (PGA), ácido láctico (PLA) e poli(láctico-co- glicólico) (PLGA). (Fonte: Srivastava *et al.*, 2013)

1.9. Modificação de propriedades de superfície

A maioria dos sistemas de entrega de drogas, incluindo as nanopartículas poliméricas são hidrofóbicos. O organismo, por meio do sistema fagocitário mononuclear (SFM), tende a remover estas nanopartículas. A fim de prolongar a circulação sistêmica das nanopartículas, evitando o SFM, é necessária a alteração das suas propriedades de superfície. Isto pode ser obtido ligando a superfície de nanopartículas com substâncias hidrofílicas, como por exemplo, o polietileno glicol, polímero de bloco de polietileno, polipropileno glicol (Pluronic), poli vinil pirrolidona e poloxamer (GREF *et al.*, 1994).

O polímero modificador de superfície mais estudado é o polietileno glicol (PEG). O PEG é um polímero não iônico e hidrofílico, composto de polietilenoglicol e polipropileno glicol. Em nanopartículas peguiladas (nanopartículas contendo PEG) as cadeias hidrófilicas são flexíveis e aumentam a sua conformação quando as opsoninas ou outra proteína abordam a superfície, o que cria uma força repulsiva que supera a força atrativa de opsoninas para as nanopartículas (Owens & Peppas, 2006). Isto diminui a taxa de opsonização das nanopartículas,

consequentemente, prolonga o tempo de circulação sistêmica (LASIC *et al.*, 1998; PARVEEN *et al.*, 2011).

Modificações de superfícies de partículas também são realizadas para incorporação de moléculas que funcionem de forma ativa para atingir um alvo específico, e pode ser feito conjugando proteínas, anticorpos, glicoproteínas e polissacáridos na superfície de nanopartículas (He *et al.*, 2010). Owais e colaboradores (2005) relataram melhor eficácia de cloroquina quando encapsulada em lipossomas conjugado com anticorpo contra *Plasmodium berghei*, em comparação com lipossomas sem modificação da superfície.

Macrófagos são conhecidos por apresentarem uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões (RRP) em sua superfície (Gupta *et al.*, 2009). Estes RRP identificam moléculas de patógenos associados em parasitas e são cruciais na resposta da imunidade inata e adaptativa. Exemplos de RRP incluem receptores do tipo toll, receptor scavenger e receptor de lectina do tipo C (HAMDY *et al.*, 2008).

Utilizar as especificidades da superfície dos macrófagos para direcionamento de nanopartículas, como sistemas de entrega de drogas de forma ativa, é uma importante abordagem para aumentar a eficácia e diminuir efeitos colaterais no tratamento de diversas doenças. Por exemplo, foi demonstrado que encapsular saquinavir em nanopartículas Poli (cianoacrilato de alquilo - PACA) leva ao aumento na captação das mesmas pelos macrófagos infectados por HIV em sistemas experimentais, bem como diminuição da atividade viral (BENDER *et al.*, 1996).

1.10 O receptor de manose

O receptor de manose (**Figura 10**) é um receptor transmembranar do tipo 1 constituído por três domínios, estes incluem um domínio rico em cisteína capaz de se ligar aos açúcares sulfatados, um domínio de fibronectina do tipo II que se liga ao colágeno e um domínio do tipo C-lectina que se liga a açúcares como a manose D, L-fucose ou N-acetil glucosamina (Napper *et al.*, 2001). Este receptor também é conhecido como CD206, e é expresso por um amplo tipo de células, tais como monócitos imaturos murino e humano, derivados de células dendríticas, linfáticas, células endoteliais hepáticas, epitélio pigmentado da retina, células mesangiais renais e macrófagos (East *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2005). A D-manose é um tipo de açúcar que pode ser reconhecido por este receptor.

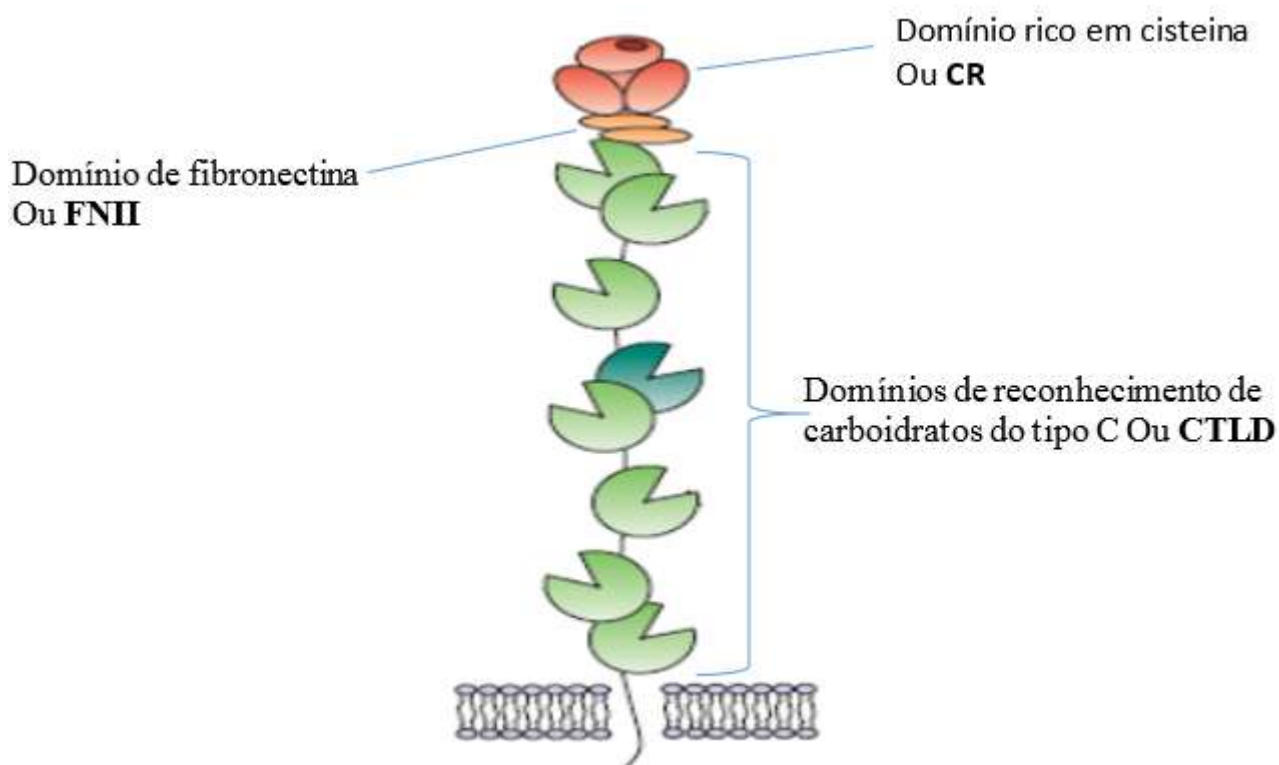


Figura 10. Receptor de manose mostrando os três domínios do receptor com afinidade para diferentes biomoléculas. **Fonte** Pomares et al,(2012)

Sendo a leishmaniose uma doença que envolve fortemente os macrófagos, tem-se utilizado manose associada a sistema de entrega de fármacos para atingir receptores de manose como forma de aumentar a especificidade dos tratamentos para esta doença (Banerjee *et al.*, 1996; Singodia *et al.*, 2012). Com o objetivo de aprimorar uma melhoria na vacina para leishmaniose, nanopartículas de polianidrido funcionalizadas com D-manose foram investigadas para induzir a ativação de células dendríticas, estas nanopartículas conseguiram ativar as células dendríticas *in vitro* em comparação com as nanopartículas não funcionalizadas (Carillo *et al.*, 2011). Outro estudo utilizando lipossomas funcionalizados com manose contendo antibiótico, foi o derivado do benzilo MT81 o qual foi mais eficiente para eliminar amastigotas intracelular de *Leishmania donovani* dentro de macrófagos de baço em comparação com o fármaco sozinho ou encapsulado em lipossomas (MITRA *et al.*, 2005). No caso de leishmaniose em que os macrófagos possuem um papel importante, é fundamental este tipo de abordagem. Dessa forma, neste trabalho foi desenvolvido um sistema de entrega de fármaco, contendo itraconazol e funcionalizado com manose, no intuito de aumentar a eficácia do tratamento contra diferentes tipos de leishmania, tanto na forma amastigota como promastigota.

1.11 Justificativa

Antimoniais pentavalentes disponíveis como estibogluconato de sódio (Pentosam®) ou N-antimoniato de metilglucamina (Glucantime®), tem sido considerado como tratamentos padrões de leishmaniose visceral. No entanto, a resistência a compostos antimoniais tem chamado atenção para novas formas de tratamento. Drogas de segunda geração tanto como anfotericina B quanto pentamidina têm sido aplicadas, mas graves efeitos colaterais têm sido relatados no uso de ambas as drogas. Para diminuir os efeitos adversos da droga e aumentar a eficácia dessas, um sistema de “entrega de drogas” pode ser aperfeiçoado e uma nova abordagem pode ser considerada, buscando melhores resultados.

Diante dessa realidade, o desenvolvimento de nanopartículas de PLGA recobertas com manose contendo itraconazol para o tratamento da leishmaniose, pode auxiliar em tratamentos efetivos dessa doença, utilizando um sistema novo com baixo nível de citotoxicidade e boa eficácia.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de nanopartículas de PLGA contendo ITZ com manose contra leishmaniose *in vitro*

2.2. Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar as nanopartículas contendo itraconazol e recoberto com manose;
- Determinar a citotoxicidade de nanopartículas contendo itraconazol sem/com manose contra macrófagos de THP -1 e J774;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas contendo itraconazol sem/com manose em THP intracelular 1 infectados com *Leishmania infantum*, *Leishmania viania panamensis*, *Leishmania viania braziliensis*;
- Determinar a atividade anti-promastigota de nanopartículas contendo itraconazol sem/com manose contra *Leishmania infantum*;
- Determinar a atividade anti-amastigota de nanopartículas contendo itraconazol sem/com manose contra os macrófagos THP 1 infectados com *Leishmania infantum*, *Leishmania viania panamensis*, *Leishmania viania braziliensis*.

3. Metodologia

3.1. Materiais

Os principais equipamentos, materiais e reagentes que foram utilizados estão listados nas **Tabelas 1, 2 e 3**, respectivamente.

Tabela 1. Lista de equipamentos utilizados.

Equipamento	Fabricante
Balança analítica Série AUY-220	Shimadzu, JAP
Câmara de Neubauer	C.A Hausser & Son ,EUA
Centrifuga Mikro 22R	Andreas Heitich GmbH &Co KG ,ALE
Espectrofotômetro SpectraMaX M2	Molecular Devices, EUA
Estufa	Thermo Scientific FormaSteriCycle,EUA
Fluxo Laminar	Veco,BRA
Homogenizador	Quimis Aparelhos Científicos,BRA
HPLC	Shimadzu, Tóquio, JAP
Microscópio de luz invertido CK2	Olympus Optical Co, Ltd., Japão
Microscopia electronica de varredura JSM 7001F	JEOL ,JAP
Microscopia eletrônica de transmissão JEM 1011	JEOL JAP
Metalizador SCD 050	Balzers, ALE
Rotorevaporador	Buchi rotary evaporator, SUI
Vortex	Quimis Aparelhos Científicos,BRA
Zeta Sizer Nano ZS90	Malvern, Worcestershire, ING

Tabela 2. Lista de materiais utilizados.

Materiais	Fabricante
Criotubos	TPP [®] , ALE
Frascos de Cultura	TPP,ALE
Microtubo tipo eppendorf 2 mL	E-Lab Commerce [®] , BRA
Placas de 96 Poços	ProLab,BRA
Papel filtro	J. Prolab, BRA
Seringa 20 mL BD Plastipak [™]	Becton, Dickinson [®] (BD), BRA
Tubo de Eppendorf	TPP,ALE
Tubos Falcon de 15 e 50mL	TPP,ALE

Tabela 3. Lista de reagentes utilizados.

Reagentes	Fabricante
Acetona	Qhemis, BRA
Acetonitrilo	JT Baker, EUA
Álcool	Zulu, BRA
Álcool polivinílico	Vetec, BRA
Antibiótico(Penicilina-Estreptomicina)	Gibco, EUA
Azul Tripán	Sigma Aldrich City, EUA
Concanavalina A	Sigma Aldrich City, EUA
DCC (N- 3-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida)	Sigma Aldrich City, EUA
Dimetilo sulfóxido(DMSO)	Sigma Aldrich City, EUA
Etilenodiamina (EDA),	Sigma Aldrich City, EUA
Manose	Sigma Aldrich City, EUA
Metanol	JT Baker, EUA
MTT 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio	Sigma Aldrich City, EUA
N-hidroxi-succinimida (NHS)	Sigma Aldrich City, EUA
PLGA (Co-glicólico ácido poliláctico)	Sigma Aldrich City, EUA
PMA (miristato acetato de forbol)	Sigma Aldrich City, EUA
tampão fosfato-salina(PBS)	Laboreclin, BRA
TFA (ácido trifluoroacético)	Sigma Aldrich City, EUA

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação das nanopartículas .

As nanopartículas (NPs) foram preparados pelo método descrito por nanoprecipitação Fessi & Herier (1989) com modificação. Resumidamente, 50 mg de polímero PLGA foi pesado, 5 mg de itraconazol foi pesado e misturado com o polímero. Em seguida, a mistura foi dissolvida em 5 mL de acetona e esta solução foi adicionada lentamente, gota a gota, em 10 mL de solução 1% de álcool polivinílico sob um agitador magnético. A mistura foi submetida a rotoevaporação sob vácuo a 40 °C para remover a acetona. A suspensão de nanopartículas foi então centrifugada a 20.000 g a 20 °C durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso com um volume igual de água MilliQ. O processo foi repetido três vezes. O *pellet* final foi

ressuspensão numa solução de PBS estéril e mantido na geladeira. Para preparar nanopartículas vazias o mesmo protocolo foi seguido, sem a adição de itraconazol.

3.2.2. Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC

O equipamento de cromatografia (Shimadzu-Destaque) é composto de um desgaseificador (Modelo DGU 20A5), módulo de entrega solvente (modelo LC-20AT), amostrador automático (modelo SIL-20AHT), forno de coluna (modelo CTO-20A), detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) e controlador de sistema CBM-20A. Em fase reversa C18 coluna ACE AQ (25 × 0,4 centímetros, 5 mM tamanho de partícula) (ACE, Aberdeen, Escócia), com uma pré-coluna (25 × 0,4 centímetros, 5 mM tamanho de partícula) (ACE, Aberdeen, Escócia) foram utilizados. A análise foi realizada como 30 ° C com um volume de injeção de 10 µL.

Para determinar a concentração de itraconazol, 10µL de formulação de nano foi dissolvida em 10 ml de metanol de grau HPLC. A amostra foi, em seguida, filtrada através de filtro de nylon de 0.22 µm em frasco de vidro de HPLC. Os frascos foram medidos em HPLC com uma coluna C18, utilizando uma fase móvel. A fase móvel foi obtida a partir da mistura de 0,12% de TFA em água Milli-Q (Bomba A) e 0,12% de ácido trifluoroacético (TFA) em acetonitrilo (bomba B), em proporção de 50:50. Medições fluorimétrico foram realizadas numa célula de fluxo de 12 mL, a 260 e 365 nm de excitação e emissão de comprimentos de onda, respectivamente. O volume de injeção foi de 10 µL e a taxa de fluxo, durante os ensaios foi de 1 ml / min a uma pressão de trabalho de 80 kgf/cm². A análise foi realizada com uma temperatura de coluna de 30 °C. LCsolution Software (Shimadzu, Tóquio, Japão), foi utilizado para o processamento de dados e identificação de parâmetros cromatográficos. A concentração de itraconazole foi expressa como mM (DANIELS *et al.*, 2014).

3.2.3. Adsorção de Mannose

Nanopartículas recobertas com manose foram preparados com base nos trabalhos descritos por Nahar *et al.*, (2009) e Yalcin *et al.*, (2009). Resumidamente, 50 mg de PLGA em 25 mL de PBS, pH 5.0, foram misturados com 229.5µL de N-hidroxi succinimida e 765µL de N • 3-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida (DCC). Depois de uma hora, 765 uL de etilenodiamina (EDA) 4.3M e 100 mg de D-manose foram adicionados e a solução foi deixada por 12 horas sob agitação. Em seguida foram lavadas com água milliQ por meio de centrifugação a 20000 xg, durante 15 minutos a 20 ° C, por três vezes.

3.2.4. Caracterização coloidal e estabilidade

Para a caracterização coloidal das nanopartículas preparadas, assim como a avaliação de suas estabilidades, o tamanho (diâmetro hidrodinâmico - DH), o índice de polidispersibilidade (PDI) e potencial zeta foram determinados. Cada amostra foi homogenizada por meio de um vortex por 30 segundos. E 10 µL de cada amostra foram diluídos em 990 µL de PBS filtrado. O Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersidade foram determinados utilizando o espalhamento dinâmico de Luz e Potencial Zeta das nanopartículas foi determinado utilizando o mobilidade electroforética da Zetasizer (Malvern Nano ZS90, Worcestershire, Inglaterra). Para avaliar a estabilidade alíquotas de 1mL de amostras de PLGA, PLGA Manose, PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose foram guardadas em condições a 4 °C, 37 °C e temperatura ambiente . Durante 1, 7, 14, 30, 45 e 60 dias. As amostras foram medidas em ZetaSizer. Cada amostra foi medida 3 vezes com 14 leituras por medição e 100 leituras por medição para determinar o diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta, respectivamente a 25 ° C

3.2.5. Análise por microscopia eletrônica

Para análise por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), 30 µL da nanopartículas foi dissolvida em 1 mL de água MilliQ. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos. O pellet foi suspenso em 1 mL de 4% paraformaldeído e mantido durante 30 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi então lavada duas vezes em água destilada por meio de centrifugação e sobrenadante descartado. Depois da segunda lavagem, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de água MilliQ e 20 µL da mistura foi colocada no topo de

stub e deixada para secar durante a noite num dessecador. O stub foi recoberto com ouro pelo metalizador (Balzers SCD 050, Alemanha) e então colocado em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 7001F, Japão). Para a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), 10 μ L de nanopartículas foram diluídas em 1mL de solução PBS. E 20 μ L de amostra foi colocada em tela de cobre e depois de terem sido exposta a ósmio em uma câmara de fumação, durante 24 horas para secar a amostra. As nanopartículas foram observadas em MET (JEOL JEM 1011, Japão).

3.2.6. Ensaio de quantificação de manose em nanopartículas

Uma curva padrão foi estabelecida por meio da preparação de diferentes concentrações de manose em água Milli Q. Que variaram de 200 nM para 5000000 nM. Aliquotas de 1 mL da amostra foram misturados com 3mL de ácido sulfúrico concentrado e agitados em vórtex por 30 segundos. A mistura foi colocada em banho de gelo por 2 minutos. A absorbância da amostra foi medida a 490 nm. Levou-se em consideração a curva padrão como referência para a determinação da quantidade de manose presente na nanoformulação (ALBALASMEH *et al.*, 2013).

3.2.7. Ensaio de aglutinação de nanopartículas com manose

As nanopartículas foram diluídas dez vezes em uma solução de PBS filtrado. 100 μ L das nanopartículas, foi misturada com uma solução de 500 μ L de 10 mM de Conconavalina A contendo 5 mM de CaCl₂ e MgCl₂. A densidade óptica da mistura foi monitorizada num espectrofotometro a 360 nm (WU *et al.*, 2012).

3.2.8 Cultivo de células de mamíferos

Os ensaios *in vitro* foram realizados nas linhagens celulares imortalizadas de monócitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202 ® TM) e macrófagos murinos J774 (ATCC TIB-67 ® TM) adquiridos da ATCC (American Type Culture Collection – Manassas, VA, EUA) por meio do banco de células do Rio de Janeiro.

3.2.8.1 Congelamento e descongelamento

Para descongelar linhagens celulares de monócitos humanos THP-1 ou macrófagos murinos J774 frascos foram tomadas a partir de um tanque de nitrogênio líquido. Os frascos continham 1×10^6 células/mL e foram colocados a temperatura ambiente. Após descongelamento, as células foram transferidas para frasco de 5 mL de meio de RPMI completo (RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U / mL de penicilina e 100 μ g / ml de estreptomicina). As células foram mantidas em incubadora, cuja atmosfera era de 5% de CO₂ em ar, a umidade saturada e a temperatura de 37 °C durante 24 horas. Em seguida, as células foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL. O tubo foi centrifugado a 2000 g durante dois minutos. O sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspenso em meio completo de RPMI.

Para congelar, 1×10^6 células/mL (número determinado a partir da contagem em câmara de Neubauer) foram suspensas num agente crioprotector contendo 5% de DMSO e 95% de soro fetal bovino. O tubo foi colocado no congelador -80 °C durante 24 horas, em seguida transferido para o tanque de nitrogênio líquido.

3.2.8.2 Passagem de células

As linhagens celulares monocítica humana THP-1 e macrófagos murinos J774 foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo e mantidas em cultura a 37 °C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ por sub-passagem a cada 4 dias, quando mostravam cerca de 80% de confluência. As células foram contadas num hemocítmetro (Marienfeld, Alemanha) na presença de azul de tripano para excluir as células não viáveis.

Células THP-1 (10^5 células/mL) foram diferenciadas na presença de 20 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante 18 h à 37 °C e foram deixadas para outras 24h em meio fresco sem PMA. Vale ressaltar que macrófagos murino J774 não necessitam desta etapa de indução de diferenciação. As células THP-1 diferenciadas ou J774 foram, em seguida, utilizadas para os ensaios de citotoxicidade ou estudos anti-leishmania.

3.2.9. Ensaios de toxicidade das diferentes nanopartículas sobre células de mamíferos

O teste de citotoxicidade celular foi avaliado pelo método de MTT conforme estabelecido na literatura (Yang *et al*,2013). Em células viáveis, enzimas mitocondriais, como a succinil-desidrogenase, reduzem o substrato MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide), formando cristais de formazan, que é um produto de cor azulada. Desta forma, a quantificação da produção desses cristais por células submetidas a determinado tratamento está correlacionada com sua viabilidade.

Para este ensaio, 1×10^4 células (de cada tipo celular) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços nas condições descritas no item 3.2.8.2. por 24 horas. Após este período, o meio foi substituído por meio contendo diferentes formulações e as células incubadas por um período de 24 h a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de mistura de ar. NP PLGA vazia com ou sem manose foram diluídas (% m/v) nas concentrações de 0,01% , 0,03%, 0,1% e 0,25%. NP PLGA ITZ e NP PLGA ITZ Manose foram testados em concentrações de 0,01 Mm; 0,02 mM e 0,2 mM de itraconazol. O itraconazol livre foi testado em concentrações de 0,02 mM; 0,06 mM e 0,43 mM. Como controle, células foram mantidas apenas em meio de cultivo, sem adição de nanopartículas ou fármaco. Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e adicionados 135 µL de meio de cultura e 15 µL de MTT e as células foram novamente incubadas a 37 °C por duas horas e 50 minutos, no escuro. Em seguida, a solução de MTT foi removida e adicionado 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). A toxicidade celular foi determinada colorimetricamente em espectrofotometria. A densidade óptica (DO) de cristais de formazan dissolvidos com DMSO foi medida utilizando um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 580 nm. A percentagem de citotoxicidade foi calculada usando a seguinte equação abaixo.

$$\text{citotoxicidade (\%)} = 100 \times (\text{DO grupo controle} - \text{DO grupo tratado}) / \text{DO grupo controle}$$

3.2.10. Ensaio Anti-leishmania

Os ensaios de atividade anti Leishmania foram realizados no laboratório de quimioterapia da CINTROP-IS na Universidade Industrial de Santander, Bucaramanga, Colômbia sob a supervisão de Profa.Dra Patricia Escobar. Os promastigotas *Leishmania (L.) infantum* (MHOM / BR / 74 / PP75), *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Leishmania (V.) Panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) foram cultivados em rotina no laboratório e mantidos numa sala escura, com uma temperatura de 27 °C.

3.2.10.1 Ensaio Anti-promastigota

Para avaliar a ação das diferentes formulações de nanopartículas sobre os parasitas extracelulares da leishmania, 1×10^6 promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM / BR / 74 / PP75), em fase exponencial de crescimento foram plaqueados em lâminas camara e mantidos a 28 °C por 72 horas. Em seguida, foram então tratados com três diluições de cada formulação ou itraconazol livre, durante 72 horas a 28 °C. NP PLGA vazia com ou sem manose foram diluídas (% m/v) nas concentrações de 0,01% , 0,03%, 0,1% e 0,25%. NP PLGA ITZ, NP PLGA ITZ Manose e itraconazol livre foram testados em concentrações de 0,03 mM; 0,1 Mm; 0,3 Mm e 0,8 mM de itraconazol. Parasitas do grupo controle foram mantidas livres de nanopartículas ou itraconazol. A inibição de crescimento do parasita foi determinada por contagem em um hemocitometro, ao microscópio, do número de parasitas corados com eosina amarelo 0,25%. A percentagem de inibição de crescimento foi calculada usando a equação abaixo.

Inibição do crescimento (%) = $100 \times (\text{número de parasitas grupo controle} - \text{número de parasitas grupo tratado}) / \text{número de parasitas grupo controle}$

3.2.10.2 Ensaio Anti-amastigota

Para avaliar a ação das diferentes formulações de nanopartículas sobre a forma amastigota da leishmania, 5×10^5 células THP-1 transformadas foram plaqueadas em lâminas

camara (Lab-Tek®,Sigma EUA) e mantidas por 24 horas a 37 °C, em incubadora. Após este período, as células foram infectadas com promastigotas *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (V.) braziliensis* de fase tardia de crescimento em uma proporção de 1:10 de células:parasita durante 24 horas nas mesmas condições anteriores. Antes do tratamento com as formulações, as células foram lavadas uma vez com PBS. As células infectadas foram tratadas por 48 horas com três diluições de nanopartículas 0,03 mM; 0,1 mM e 2,2 mM de itraconazol em meio de cultivo, nas mesmas condições anteriores. Como controle, as células foram mantidas sem a presença de nanopartículas ou do fármaco. Foram contados os amastigotas intracelulares de um total de 300 células, fixadas em metanol e coradas com Giemsa, infectadas ou não. O percentual de proliferação de amastigotas foi definido conforme a equação abaixo.

Taxa de proliferação de amastigotas (%) = $100 \times \frac{\text{número total de amastigotas contados no grupo tratado}}{\text{número total de amastigotas contados no grupo controle}}$

Alternativamente, 5×10^5 células THP-1 transformadas foram plaqueadas em lâminas camara e mantidas por 24 h a 37 °C, em incubadora. Após este período, as células foram infectadas com promastigotas *Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) Panamensis* de fase tardia de crescimento em uma proporção de 1:10 de células:parasita durante 24 horas nas mesmas condições anteriores. Antes do tratamento com as formulações, as células foram lavadas uma vez com PBS. As células infectadas foram tratadas por 48 horas com três diluições de NP PLGA ITZ 0,02 mM; 0,1 mM e 0,2 mM de itraconazol em meio de cultivo e NP PLGA ITZ Manose 0,01 mM; 0,02 mM e 0,1 mM de itraconazol em meio, nas mesmas condições anteriores. Como controle, as células foram mantidas sem a presença de nanopartículas ou do fármaco. Após os tratamentos, as células infectadas ou não foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. As lâminas foram levadas ao microscópio de luz (ZEISS Primo Star,Alemanha)acoplado com câmara digital para obtenção de fotomicrografias. A percentagem de células infectadas foi determinada como sendo a razão do número de células infectadas pelo número total de células contadas, multiplicado por 100. Além disso, as células infectadas foram agrupadas em relação ao número de formas amastigotas encontrados no interior das células. Foram determinados três diferentes grupos: grupo de células contendo 1-10 amastigotas, grupo com 11-20 amastigotas, e o grupo com mais de 20 amastigotas por célula, isso dentro de cada espécie de *Leishmania*.

3.2.11. Análise estatística

Todos os testes de análise estatística foram realizados utilizando GraphPad Prism v.5.00. ANOVA foi realizada, seguido dos testes de Bonferroni para analisar o efeito de itraconazol em diferentes concentrações, em que $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os dados foram representados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4. Resultados

4.1 Caracterização das nanopartículas

4.1.1 Propriedades coloidais das nanopartículas

Logo após a síntese das nanopartículas as suas propriedades coloidais foram determinadas. O Diâmetro Hidrodinâmico – DH médio encontrado foi de cerca de 250 nm. Os menores tamanhos foram observados para as nanopartículas de PLGA vazias, enquanto os maiores valores de DH foram observados para as nanopartículas de PLGA contendo itraconazol recobertas com manose. O potencial zeta em geral apresentou carga neutra para os quatro tipos de nanopartículas. Além disso, o PDI foi abaixo de 0,21 o que indica uma distribuição monodispersa das nanopartículas (**Tabela 4**). As nanopartículas foram preparadas em três experimentos independentes e de cada preparação as amostras foram analisadas em triplicata (n=9).

Tabela 4. Caracterização de nanopartículas polimérica de PLGA com/sem Itraconazol ou manose mostrando seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (IPD), Potencial Zeta e concentração de itraconazol (ITZ). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Amostras	Diamêtro Hidrodinâmico (nm \pm DP)	Potencial Zeta (mV \pm DP)	IPD	ITZ em formulação (%)
NP PLGA vazio	232 \pm 8,4	-1,61 \pm 1,04	0,07 \pm 0,01	NA
NP PLGA ITZ	235 \pm 12,4	-1,22 \pm 0,68	0,12 \pm 0,03	68
NP PLGA Manose	249 \pm 3,3	-2,91 \pm 1,73	0,1 \pm 0,02	NA
NP PLGA ITZ- Manose	263 \pm 12,61	-1,89 \pm 0,52	0,2 \pm 0,02	65

Legenda: NA- Não aplicável; ITZ: Itraconazol, NP - nanopartículas

4.1.2 Estabilidade das nanopartículas em condições diferentes.

A estabilidade das nanopartículas em condições diferentes de temperatura; 4 °C , 37 °C e temperatura ambiente foi analisada a partir das medidas do diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta. As nanopartículas foram submetidas as três temperaturas durante um período de 60 dias. Para a temperatura de 4 °C, as nanopartículas sem cobertura de manose apresentaram um aumento de 15% no tamanho ao longo de todo o período. No entanto, as nanopartículas com

cobertura de manose, aumentaram em mais de 23% do tamanho depois de 45 dias. Estes resultados são apresentados na **Figura 11**.

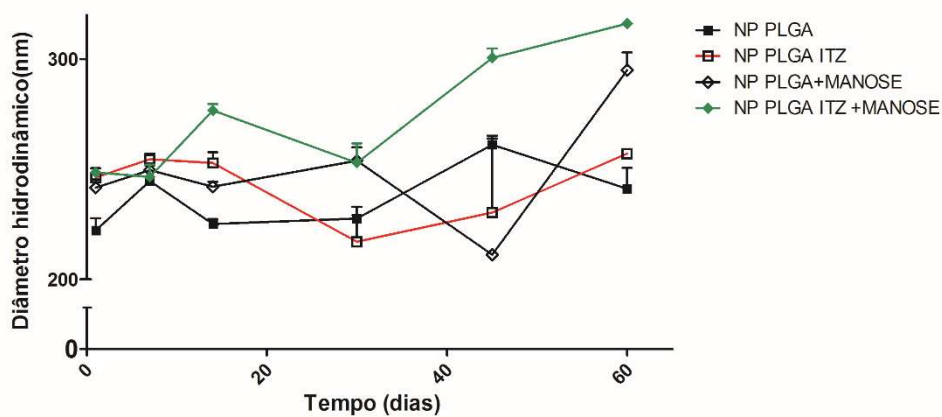


Figura 11. Diâmetro Hidrodinâmico de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a 4 °C durante um período de 60 dias.

A 4 °C, as cargas das nanopartículas poliméricas sem manose foram relativamente neutras durante todo o período. Para as nanopartículas com cobertura de manose houve um aumento do potencial zeta após trinta dias. O potencial zeta máximo observado foi de -5.54 mV para NPs de PLGA recobertas com manose, conforme apresentado na **Figura 12**.

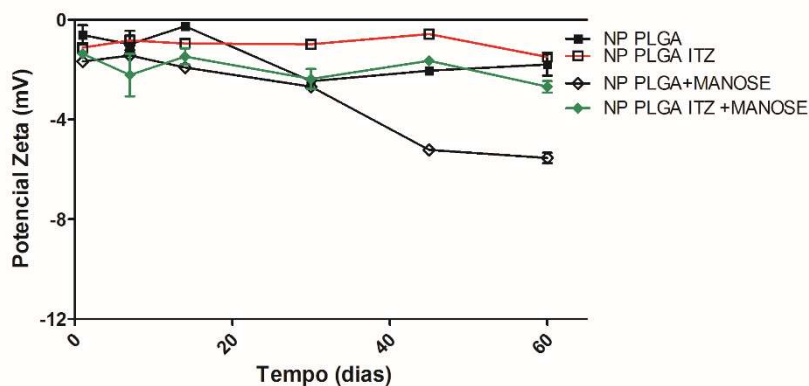


Figura 12. Potencial zeta de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a 4 °C durante um período de 60 dias.

Para a temperatura 37 °C, as nanopartículas de PLGA vazias sem manose foram estáveis ao longo do período de 60 dias, foi observado um aumento de 15% no tamanho. Ambas nanopartículas com cobertura de manose aumentaram em 20% no tamanho após 30 dias. As NPs de PLGA ITZ manose foram as mais afetadas pela temperatura, quando em apenas 14 dias estas começaram a aumentar em 20% o seu tamanho, como mostrado na **Figura 13**.

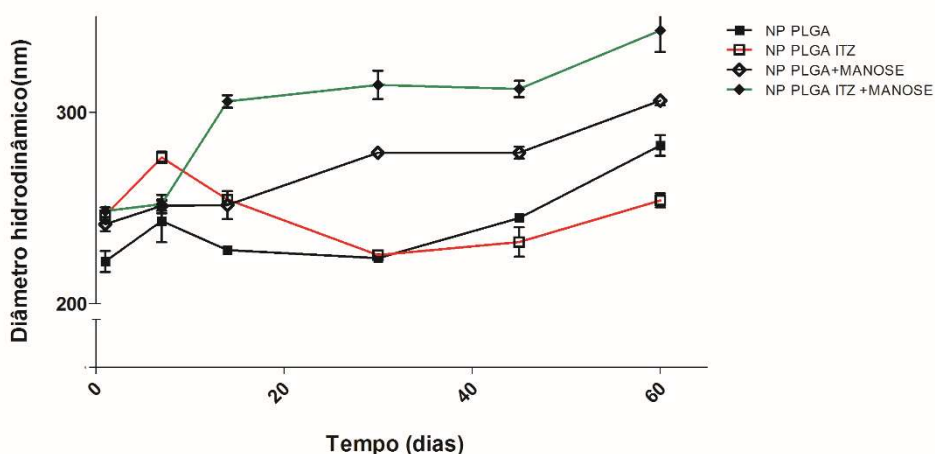


Figura 13. Diâmetro Hidrodinâmico de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a 37 °C durante um período de 60 dias.

O potencial zeta das nanopartículas poliméricas a 37 °C revelou que, com a exceção de NPs de PLGA ITZ manose, todas as outras nanopartículas apresentaram cargas relativamente neutras zero e não excedeu a -2 mV ao longo do tempo observado. Para as NPs de PLGA ITZ manose, houve uma variação do potencial zeta entre -1 a -10,4 mV durante o período de 60 dias, como demonstrado na **Figura 14**.

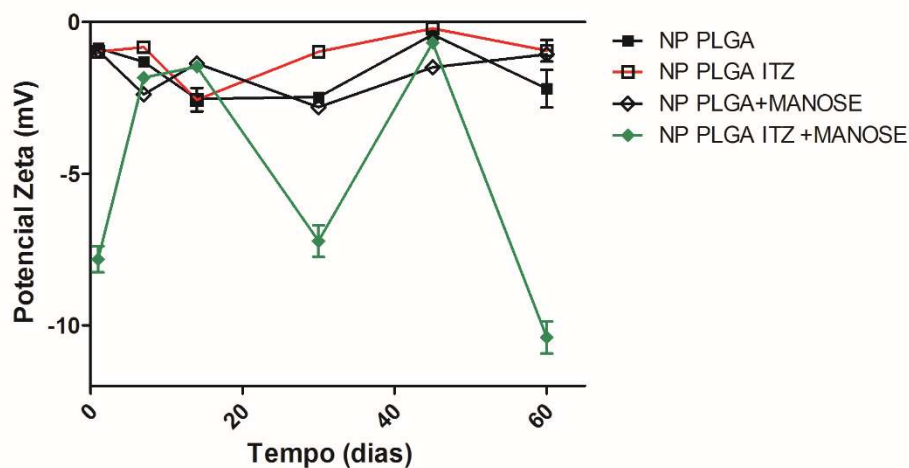


Figura 14. Potencial zeta de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a 37 °C durante um período de 60 dias.

À temperatura ambiente, as nanopartículas sem cobertura de manose apresentaram um aumento no tamanho de 15% ao longo de todo o período. No entanto, após 7 dias as nanopartículas com a cobertura de manose já aumentaram em 15% no tamanho e após 45 dias o aumento foi em torno de 41%. Os resultados são mostrados na **Figura 15**.

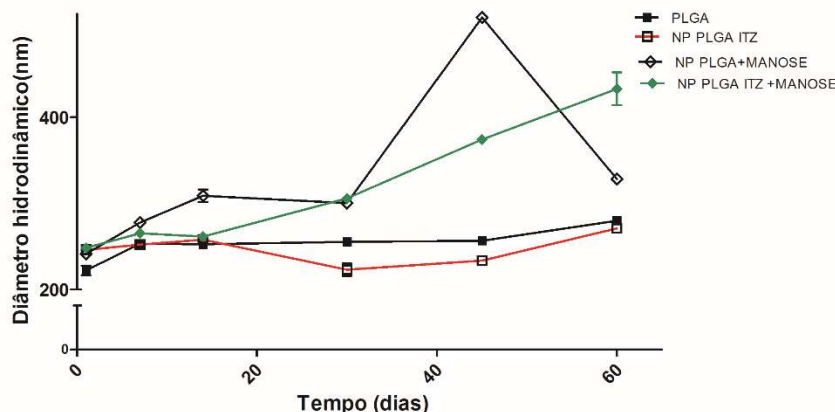


Figura 15. Diâmetro Hidrodinâmico de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a temperatura ambiente durante um período de 60 dias.

Para o Potencial Zeta, à temperatura ambiente, as nanopartículas sem cobertura de manose apresentaram uma pequena variação do potencial entre -0,6 e -2,6 mV em todo o período observado. As nanopartículas com manose apresentaram uma variação maior, chegando a um valor máximo de -9 mV. Os resultados são demonstrados na **Figura 16**.

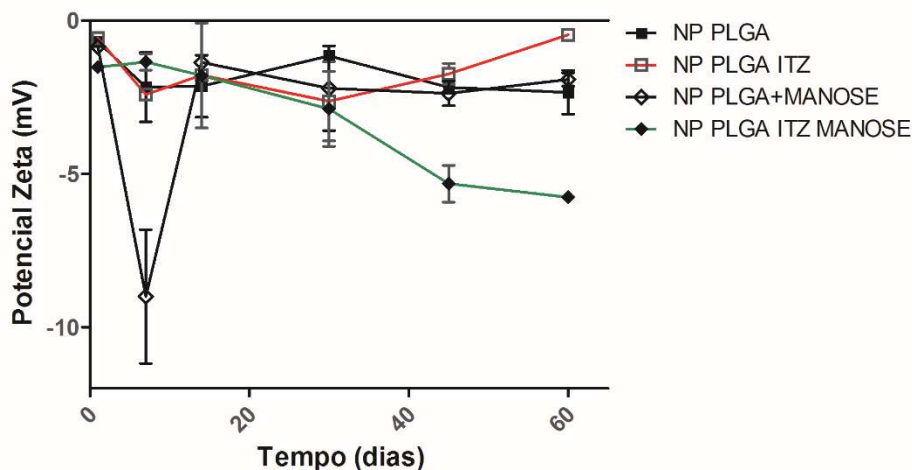


Figura 16. Potencial zeta de nanopartículas de PLGA com ou sem itraconazol (ITZ) recobertas ou não com manose matidas a temperatura ambiente durante um período de 60 dias.

4.1.3. Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão

Por meio da análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET), a morfologia das nanopartículas apresentaram-se esféricas com um diâmetro de aproximadamente de 190 nm. As nanopartículas de PLGA vazias e PLGA contendo ITZ e recobertas com manose apresentaram morfologias semelhantes. No entanto, foi observada que NPs PLGA vazias apresentaram uma região mais clara no núcleo das nanopartículas, enquanto NPs PLGA ITZ Manose apresentaram um núcleo mais escuro, indicando a presença de itraconazol. As imagens são demonstradas na **Figura 17**.

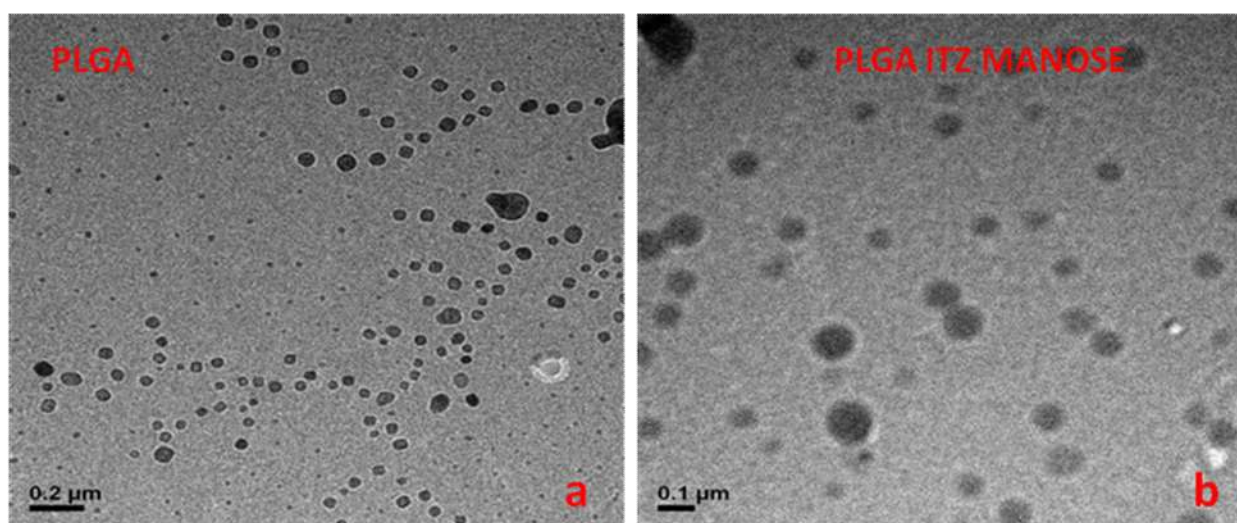


Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas poliméricas de PLGA vazias (a) e nanopartículas poliméricas de PLGA com itraconazol recobertas com manose (b).

4.1.4. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura

Por meio da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi observada a superfície, tamanho e distribuição das nanopartículas. As nanopartículas de PLGA vazias apresentaram uma superfície lisa e forma esférica. As nanopartículas apresentaram tamanho uniforme em torno de 190 nm, bem distribuídas e não agregadas. A imagem é representada na **Figura 18**.

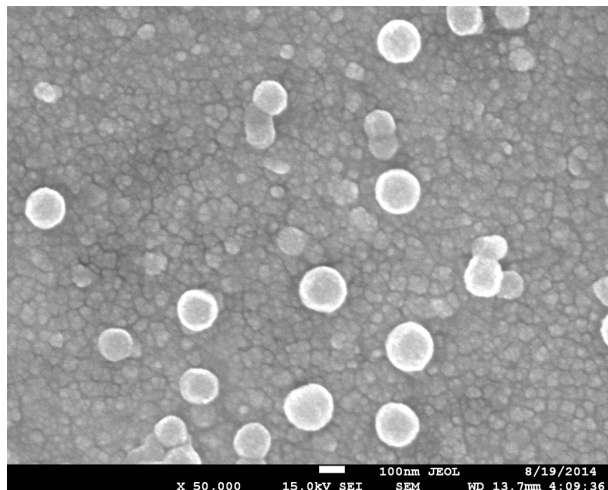


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas poliméricas de PLGA vazias mostrando a superfície lisa e a não agregação das nanopartículas. Barra de escala de 100 nm.

4.2. Determinação da presença e quantificação de manose em nanopartículas

A presença de manose nas nanopartículas foi determinada pelo ensaio de aglutinação utilizando a lectina concanavalina A, conforme mostrado na **Figura 19**. Dois tipos de nanopartículas foram testadas: PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose. Após 60 segundos, observou-se um aumento da absorbância com NPs de PLGA ITZ Manose, em contrapartida para as NPs PLGA ITZ não houve diferença. A confirmação da presença e a quantificação da manose nas nanopartículas foi determinada pelo ensaio de ácido sulfúrico. Para tanto uma curva padrão foi estabelecida usando concentrações conhecidas de manose. A curva padrão apresentou coeficiente de correlação de $R = 0,97$ a partir do qual foi determinada a concentração de manose. A curva analítica padrão pode ser visualizada na **Figura 20**.

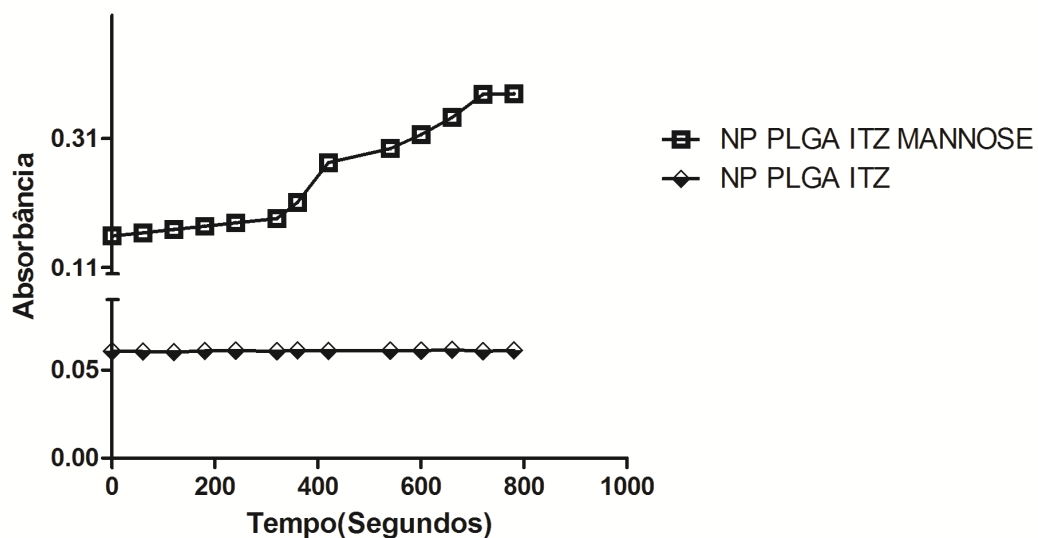


Figura 19. Aglutinação da concanavalina A com nanopartículas ligadas a manose, indicando a aglutinação entre o manose e concanavalina A na NP PLGA ITZ manose. Na PLGA ITZ não houve aglutinação devido a ausência de manose.

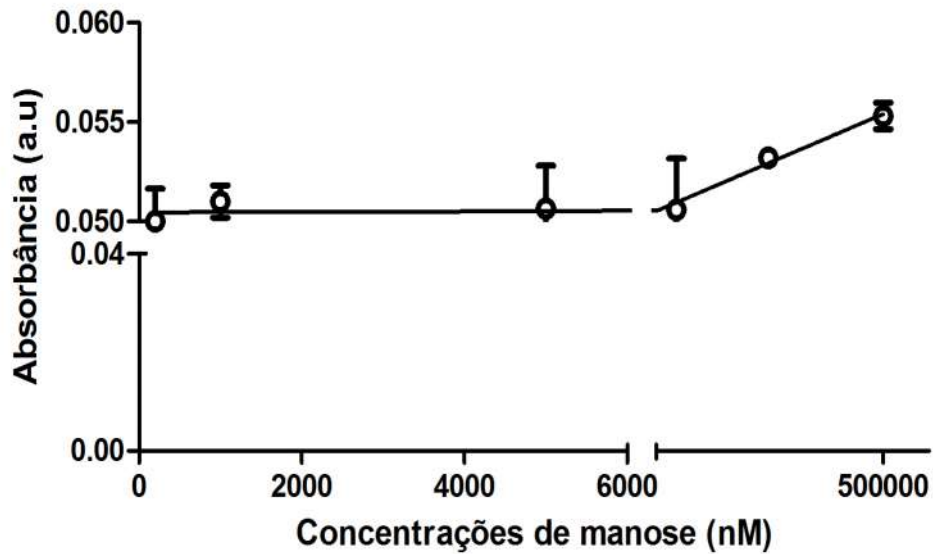


Figura 20. Curva analítica padrão da quantificação de manose em nanopartículas. As nanopartículas de PLGA contendo itraconazol recobertas com manose contêm 0,05 mM de manose.

4.3. Viabilidade celular dos macrófagos

Para avaliar a viabilidade celular, os quatro tipos de nanopartículas foram testadas contra células de macrófagos humano THP-1 e murino J774. Células THP-1 e J774 tiveram uma viabilidade de 94,06% e 98,7%, respectivamente, após a incubação com nanopartículas de PLGA vazias na concentração de 0,01% (m/v) de PLGA. Na concentração de 0,25% (m/v) de PLGA a viabilidade foi de 86,31% e 87,41% para as células THP-1 e J774 respectivamente, conforme disponível na **Figura 21**. Porém, estas diminuições da viabilidade celular não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Células THP-1 e J774 tiveram uma viabilidade de 98,3% e 96,52%, respectivamente, após a incubação com nanopartículas de PLGA na concentração de 0,01% (m/v) de PLGA recobertas com 0,05 mM de manose. Na concentração de 0,25% (m/v) de PLGA a viabilidade foi de 97,8% e 69,89% para as células THP-1 e J774 respectivamente, conforme disponível na **Figura 22**. Vale ressaltar, que somente a diminuição da viabilidade celular de J774, quando expostas a maior concentração do polímero nas nanopartículas recobertas com manose, foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

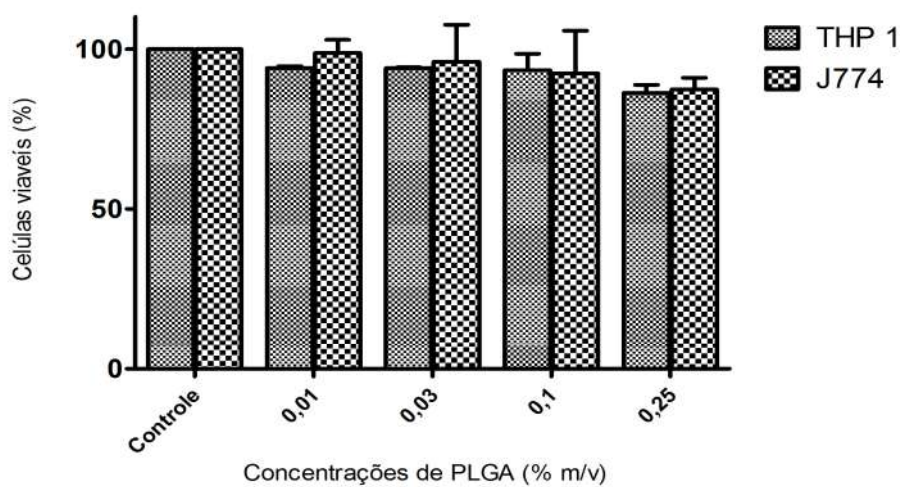


Figura 21. Viabilidade celular de macrófagos humano (THP-1) e murino (J774) após 24 horas de exposição à nanopartículas poliméricas contendo diferentes concentrações de PLGA. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Sem diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

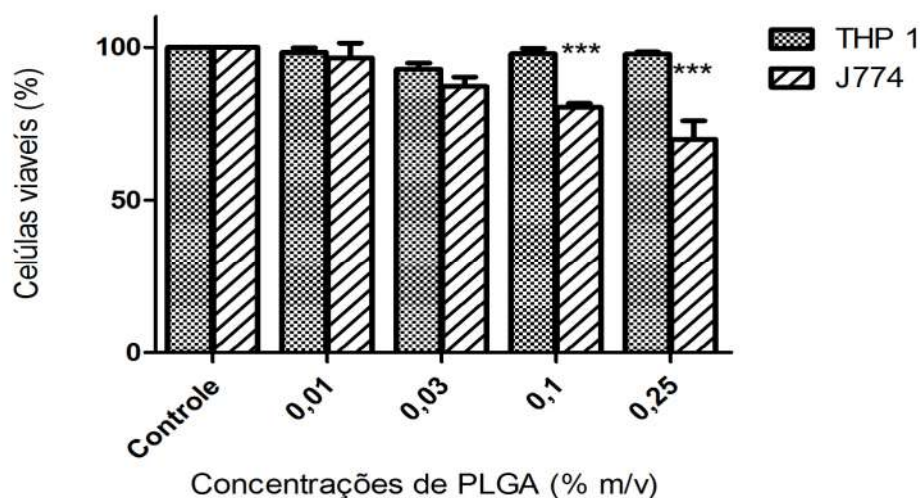


Figura 22. Viabilidade celular de macrófagos humano (THP-1) e murino (J774) após 24 horas de exposição à nanopartículas poliméricas contendo diferentes concentrações de PLGA e recobertas com 0,05 mM de manose. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * estatisticamente significativo ($p < 0,01$).

A viabilidade de macrófagos THP-1 e J774 após a exposição às nanopartículas poliméricas de PLGA recobertas com manose, porém com diferentes concentrações de itraconazol, foi avaliada. Células THP-1 tiveram uma viabilidade de 100,7% e 99,83% após a exposição à menor concentração de itraconazol (0,003 mM) presente nas nanopartículas de PLGA ITZ e PLGA ITZ manose, respectivamente. Após a exposição à 0,06 mM de itraconazol em PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose as viabilidades foram de 81,99% e 79,96%, respectivamente. Estas diminuições da viabilidade de THP-1 só foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na exposição a maior concentração do fármaco, como pode ser observado na **Figura 23**.

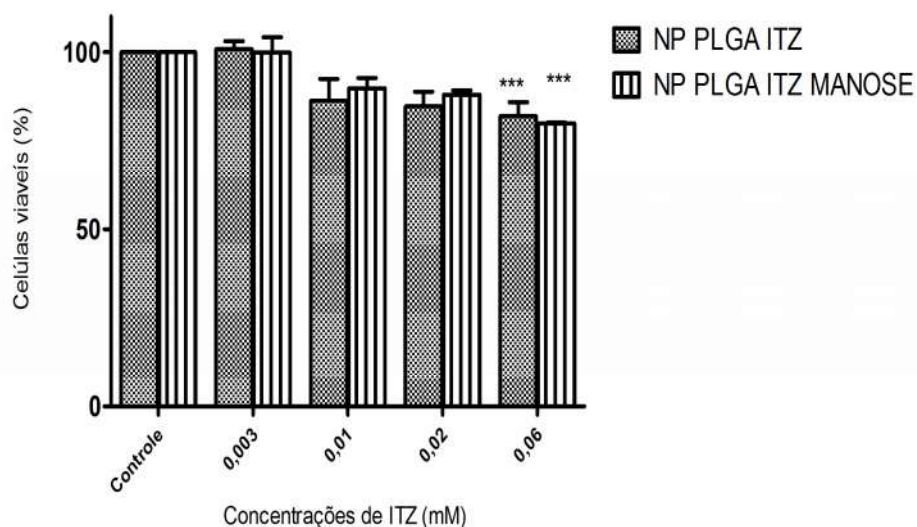


Figura 23. Viabilidade celular de macrófagos humano (THP-1) após 24 horas de exposição às nanopartículas de PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose contendo diferentes concentrações de itraconazol (ITZ). Os dados são representados pela média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

Células J774 tiveram uma viabilidade de 85,36% e 90,56% após a exposição à menor concentração de itraconazol (0,003 mM) presente nas nanopartículas de PLGA ITZ e PLGA ITZ manose, respectivamente. Após a exposição à 0,06 mM de itraconazol em PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose as viabilidades foram de 68,8% e 72%, respectivamente. Estas diminuições da viabilidade de J774 só foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na exposição a maior concentração do fármaco, como pode ser observado na **Figura 24**.

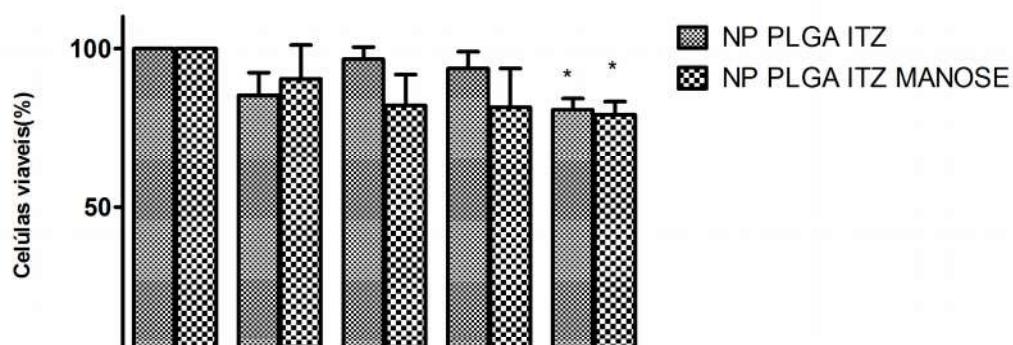


Figura 24. Viabilidade celular de macrófagos murino (J774) após 24 horas de exposição às nanopartículas de PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose contendo diferentes concentrações de itraconazol (ITZ). Os dados são representados pela média \pm desvio padrão. * estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

A viabilidade de macrófagos THP-1 e J774 após a exposição à diferentes concentrações de itraconazol livre, foi avaliada. Itraconazol livre na concentração de 0,02 mM causou citotoxicidade de 12,47% e 65,14% para as células THP-1 e J774, respectivamente. Para a concentração mais elevada de itraconazol (0,43 mM) foi observada citotoxicidade de 12,46% e 65,14% para células THP-1 e J774, respectivamente, como demonstrado na **Figura 25**. Vale ressaltar que as citotoxicidades apresentadas somente foram estatisticamente significativas para macrófagos murino ($p < 0,01$), mostrando que estas células são mais sensíveis a este fármaco.

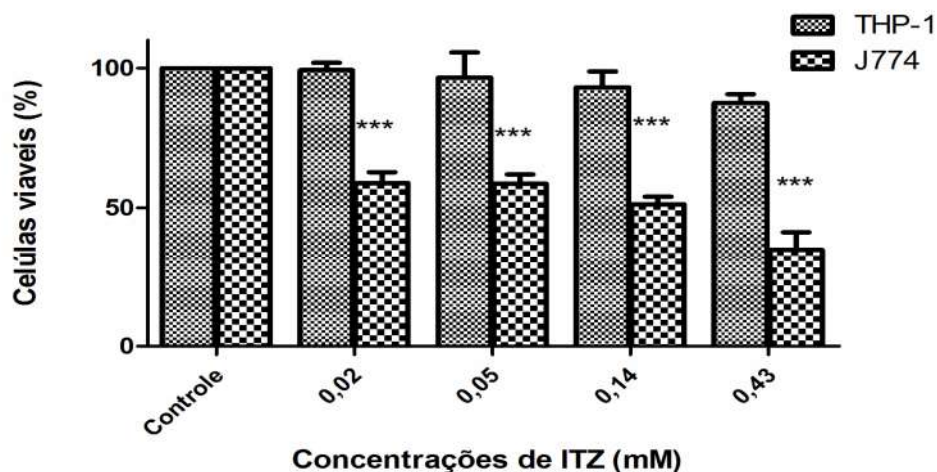


Figura 25. Efeito citotóxico da exposição, por 24 horas, de diferentes concentrações de itraconazol em macrófagos humano (THP-1) e murino (J774). Os dados são representados pela média \pm desvio padrão. * estatisticamente significativo ($p < 0,01$).

4.4. Atividade anti-leishmania de nanopartículas de PLGA, PLGA Manose, PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose contra promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (V.) braziliensis*

4.4.1 Atividade anti-leishmania de itraconazol encapsulado ou livre contra promastigotas

Os promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* foram tratados com as nanopartículas e itraconazol livre. Com a concentração de 0,03 mM de itraconazol não foi observada diferença

estatística significativa ($p > 0,05$) na inibição do crescimento dos parasitas, independente da forma como o fármaco estava disponível. No entanto, para as concentrações de 0,1 mM e 0,3 mM de ITZ, NPs de PLGA ITZ, com ou sem manose, foram mais eficazes na inibição do crescimento do parasita ($p < 0,05$) do que o fármaco livre. Porém, na alta concentração de itraconazol livre (0,8 mM) a mesma foi mais eficaz contra os promastigotas ($P < 0,05$) em comparação com o fármaco encapsulado nas nanopartículas, como representado na **Figura 26**.

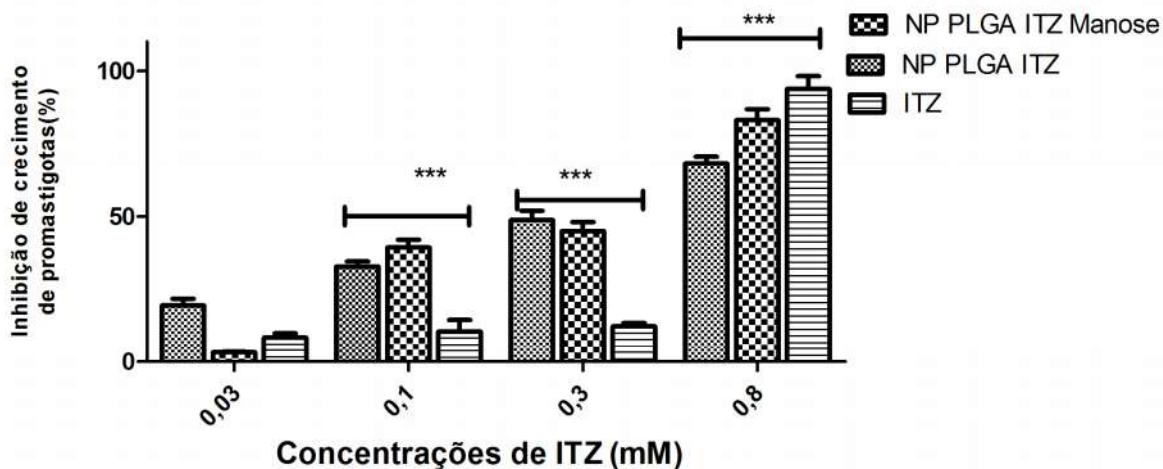


Figura 26. Percentual de inibição do crescimento de promastigotas do *Leishmania (V.) infantum* quando expostos por 72 horas a 28 °C à itraconazol livre, nanopartículas poliméricas de PLGA com ITZ e PLGA com ITZ recobertas com manose, em diferentes concentrações do fármaco. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** diferença estatística de $p < 0,001$.

Nanopartículas poliméricas com diferentes concentrações de PLGA recobertas com 0,05 mM de manose, porém sem o encapsulamento do fármaco, foram testadas para a atividade anti-leishmania. Foi observada uma inibição do crescimento dos promastigotas acima de 20% quando expostos às nanopartículas poliméricas com 0,25 % (m/v) de PLGA, conforme demonstrado na **Figura 27**.

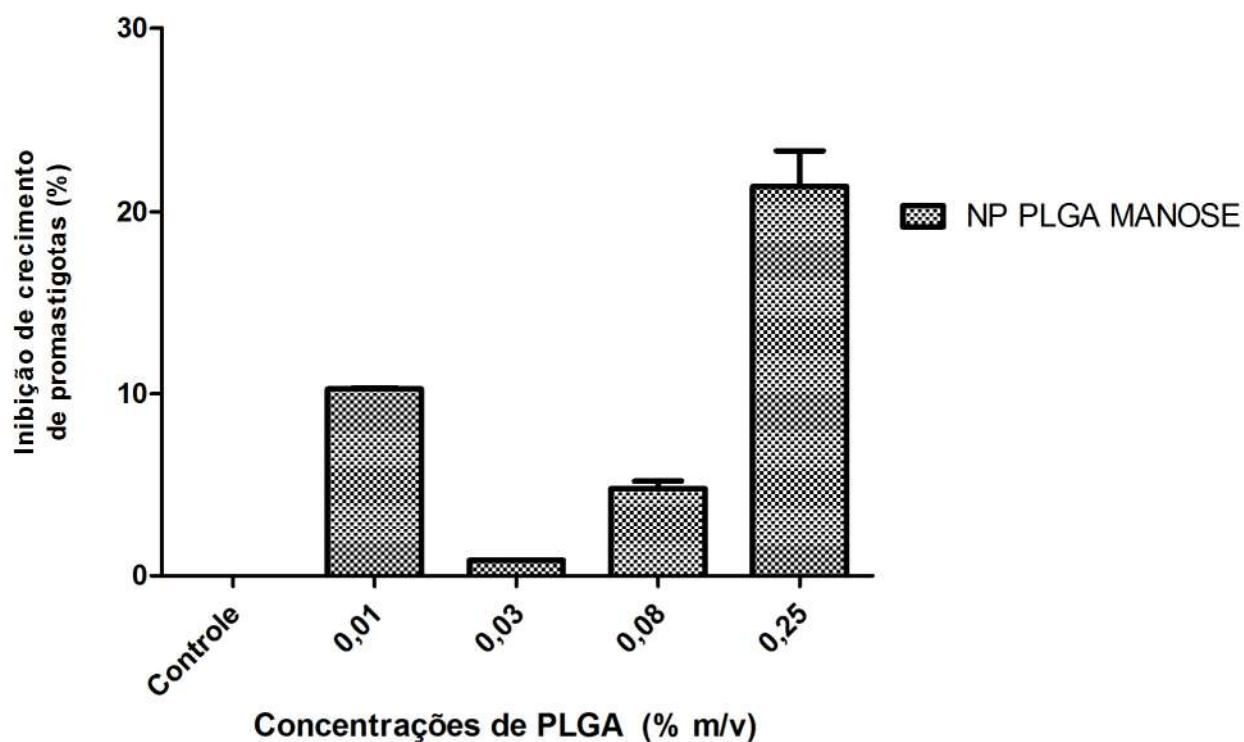
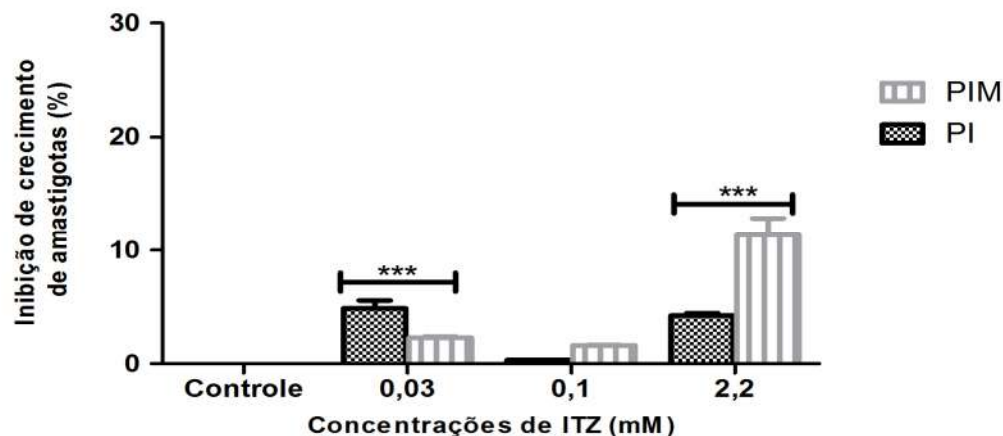


Figura 27. Percentual da inibição do crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* quando expostos por 72 horas a 28 °C às nanopartículas poliméricas com diferentes concentrações PLGA e recobertas com 0,05 mM de manose, sem fármaco . Os dados representam a média \pm desvio padrão.

4.4.2 Atividade anti-leishmania *in vitro* contra amastigotas

As duas nanopartículas de PLGA ITZ e PLGA ITZ manose foram testadas contra duas cepas de amastigotas. Somente para a concentração de 2,2 mM as nanopartículas demonstraram atividade anti-leishmania. A NP PLGA ITZ manose foi eficaz contra *Leishmania (V.) braziliensis* inibindo 59% dos parasitas. Como representado na **Figura 28**.

A



B

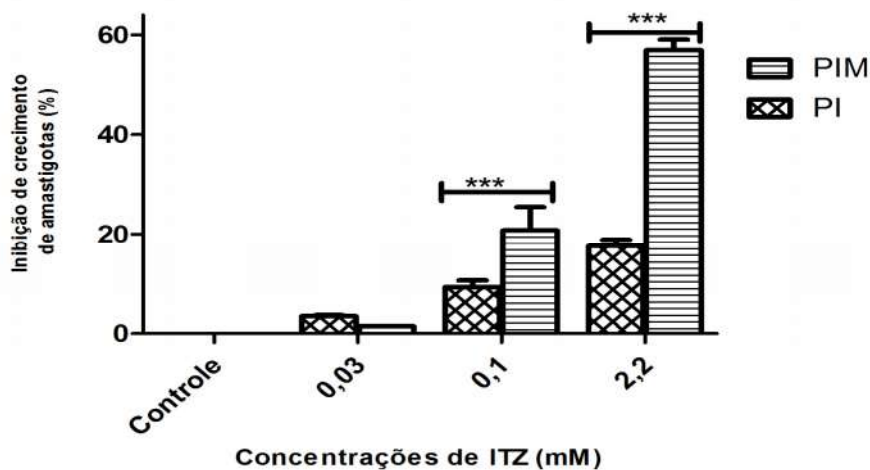


Figura 28. Percentual de inibição do crescimento de amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (A) após exposição por 48 horas a diferentes concentrações de itraconazol presentes em nanopartículas de PLGA ITZ (PI) e PLGA ITZ Manose (PIM). As nanopartículas de PLGA ITZ apresentaram maior inibição em comparação com nanopartículas de PLGA ITZ manose a 0,03 mM (5% contra 2%), mas PLGA ITZ Manose apresentou maior inibição a 2,2 mM de 11,4% em comparação com 4,4% de NPs PLGA ITZ. *Leishmania (V.) braziliensis* (B) As nanopartículas de PLGA ITZ manose apresentaram maior inibição em comparação com nanopartículas de PLGA ITZ sem manose a 0,1 mM de 20% em comparação com 9%, enquanto a 2,2 mM as NP PIM mostraram uma inibição estatisticamente maior ($p < 0,001$) de 57% em comparação com 18% apresentado pelas nanopartículas contendo o itraconazol sem manose. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

A inibição de amastigotas com itraconazol livre mostrou alta atividade contra *Leishmania (V.) braziliensis* (88%) do que em relação a *Leishmania (L.) infantum* (45%) para a mesma concentração de 0,5 mM. Houve uma diferença estatística significativa sobre a eficácia do itraconazol contra *L.(V.) braziliensis* em comparação com o *L (L.) infantum*. Como é demonstrado na **Figura 29**.

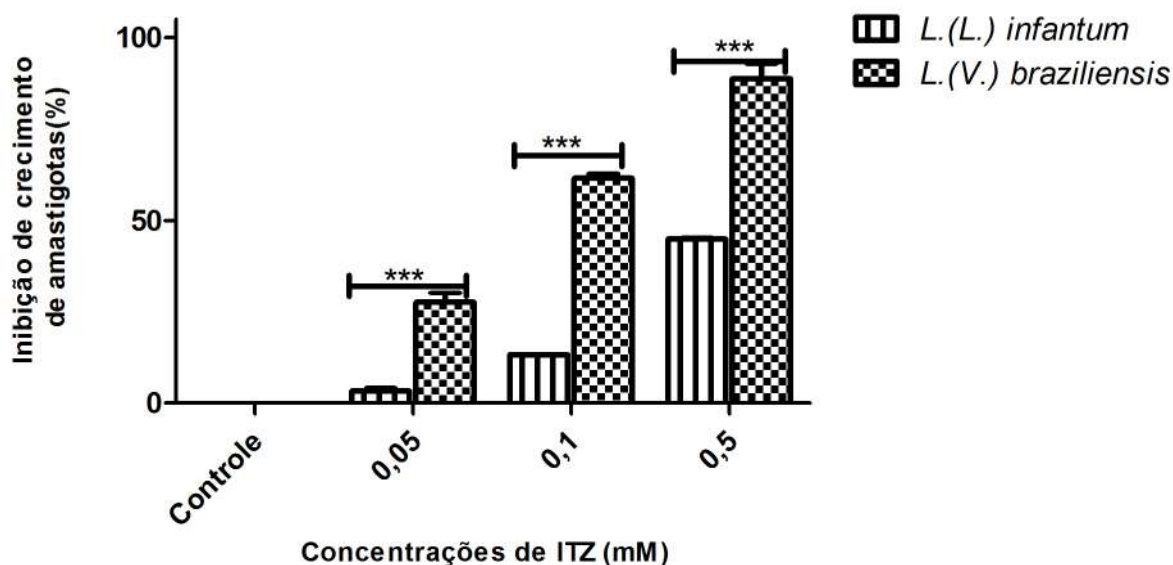


Figura 29. Percentual de inibição de amastigotas após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de itraconazol livre. O fármaco apresentou melhor eficácia contra amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* do que *Leishmania (V.) braziliensis*. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

Alternativamente, a avaliação da atividade anti-leishmania foi realizada determinando a variação do percentual de células infectadas com diferentes números de amastigotas presentes no interior das células após a exposição por 48 horas à três diferentes concentrações de itraconazol encapsulado em nanopartículas poliméricas de PLGA recobertas ou não com manose.

Os monócitos da linhagem celular THP-1 foram transformados em macrófagos e em seguida foram infectadas *in vitro* com as cepas de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania panamensis* de promastigotas na fase estacionária. Estes promastigotas transformaram-se em amastigotas intracelulares obrigatórios e foram tratados com NPs de PLGA ITZ e PLGA ITZ Manose para a verificação da atividade anti-leishmania. Os macrófagos infectados foram corados com Giemsa e fotomicrografias foram obtidas.

A atividade anti-leishmania de NP PLGA ITZ Manose sobre células THP-1 transformadas e que foram infectadas com *L. (V.) braziliensis* foi mais evidente quando a concentração do fármaco era de 0,1 mM, o que pode ser observado pela redução do número de amastigotas intracelulares presentes na célula em comparação ao grupo controle que não sofreu qualquer tratamento conforme ilustrado na **Figura 30**.

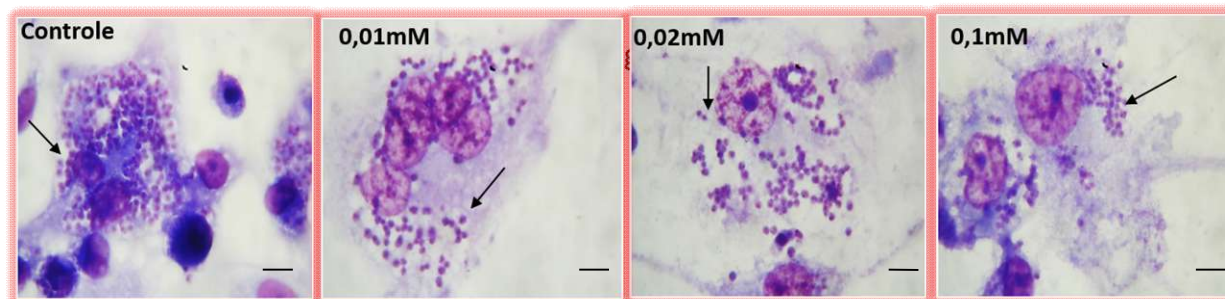


Figura 30. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol e recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM, 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,1 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares. Barra de escala 20 μ m.

A análise da percentagem de células infectadas com *Leishmania (V.) braziliensis* mostrou que a exposição a NP PLGA ITZ Manose nas concentrações mais baixas testadas (0,01 e 0,02 mM) não causaram alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na percentagem de células

infectadas para todos os grupos de células contendo diferentes números de amastigotas por células em relação aos seus controles, células sem tratamento. No entanto, o tratamento com NPs contendo itraconazol a 0,1 mM causou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) da porcentagem de células com mais de 20 amastigotas por células, passando de 55% para 28%, enquanto que as porcentagens de células com 1-10 amastigotas/células e com 11-20 amastigotas/células aumentaram significativamente em relação aos controles, passando de 17% para 30% e 29% para 42 %, respectivamente (**Figura 31**).

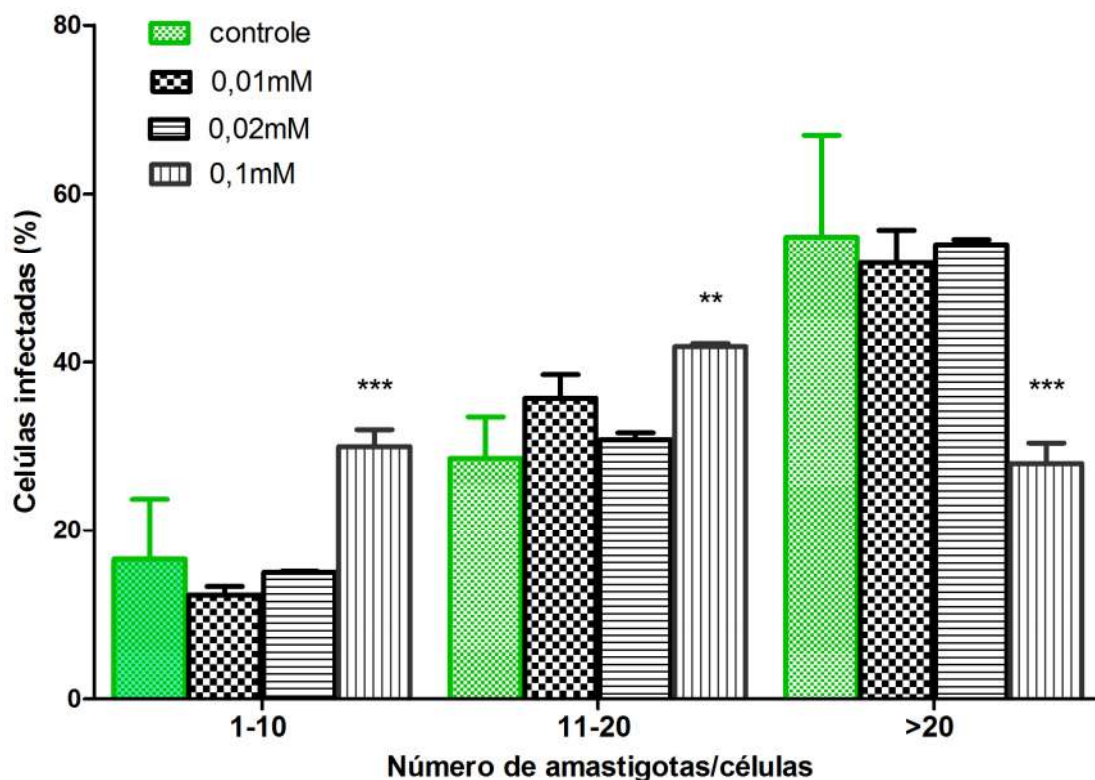


Figura 31. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania (V.) braziliensis* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM; 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

A atividade anti-leishmania de nanopartículas de PLGA com diferentes concentrações de itraconazol porém sem a cobertura de manose sobre células THP-1 transformadas e que foram infectadas com *L. (V.) braziliensis* foi maior na concentração de 0,2 mM de itraconazol, como observado a partir da presença reduzida de amastigotas intracelulares nesta condição quando comparado ao controle sem tratamento (**Figura 32**).

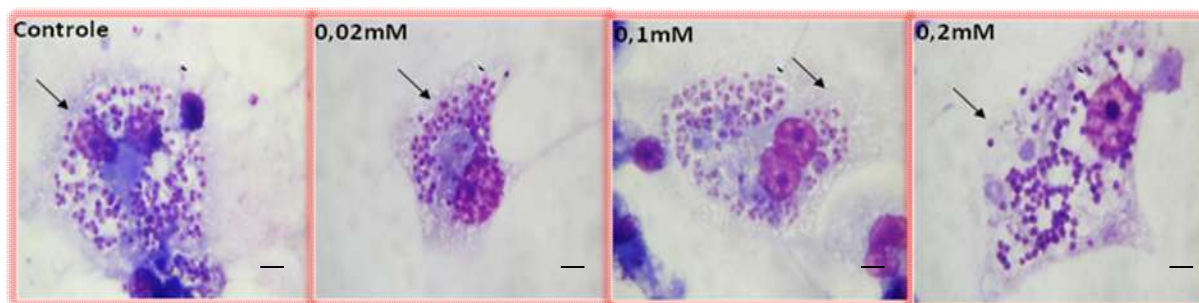


Figura 32. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM, 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,2 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares. Barra de escala 20 μ m.

A análise da porcentagem de células infectadas com *Leishmania (V.) braziliensis* mostrou que a exposição a NP PLGA ITZ sem cobertura de manose nas concentrações mais baixas testadas (0,02 e 0,1 mM) não causaram alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na porcentagem de células infectadas para todos os grupos de células contendo diferentes números de amastigotas por células em relação aos seus controles, células sem tratamento. No entanto, o tratamento com NPs contendo itraconazol a 0,2 mM causou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) da porcentagem de células com mais de 20 amastigotas por células, passando de 54,86% para 21,1%, enquanto que a porcentagem de células com 1-10 amastigotas/células aumentou significativamente ($p < 0,001$) em relação ao controle, passando de 16,54% para 44,9%; a porcentagem de células com 11-20 amastigotas/células não foi alterada significativamente em relação ao controle (**Figura 33**).

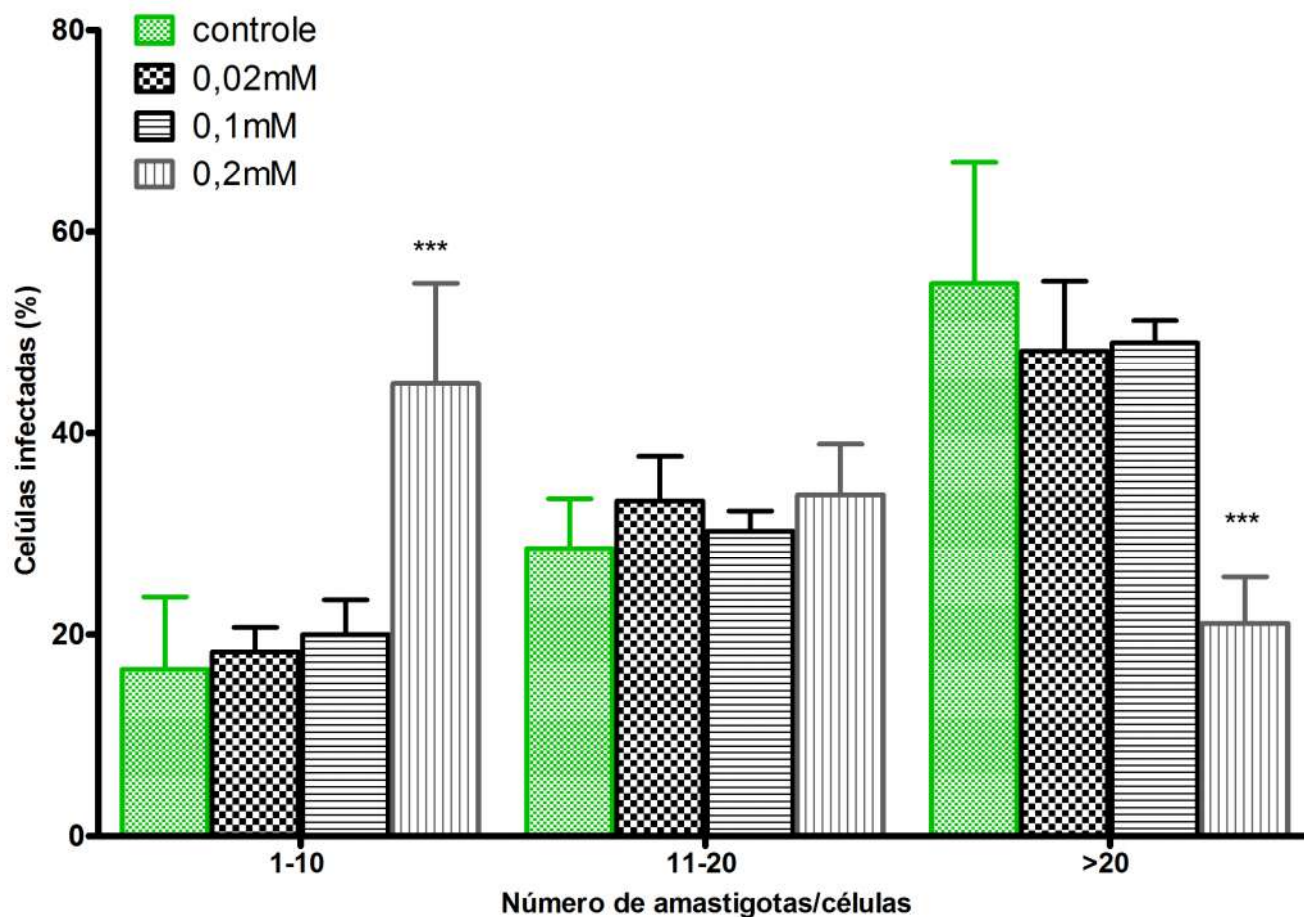


Figura 33. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania (V.) braziliensis* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM; 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

A atividade anti-leishmania de NP PLGA ITZ Manose sobre células THP-1 transformadas e que foram infectadas com *L. (L.) infantum* foi evidente a medida que a concentração do fármaco aumentou, o que pode ser observado pela redução do número de amastigotas intracelulares presentes na célula em comparação ao grupo controle que não sofreu qualquer tratamento conforme ilustrado na **Figura 34**.

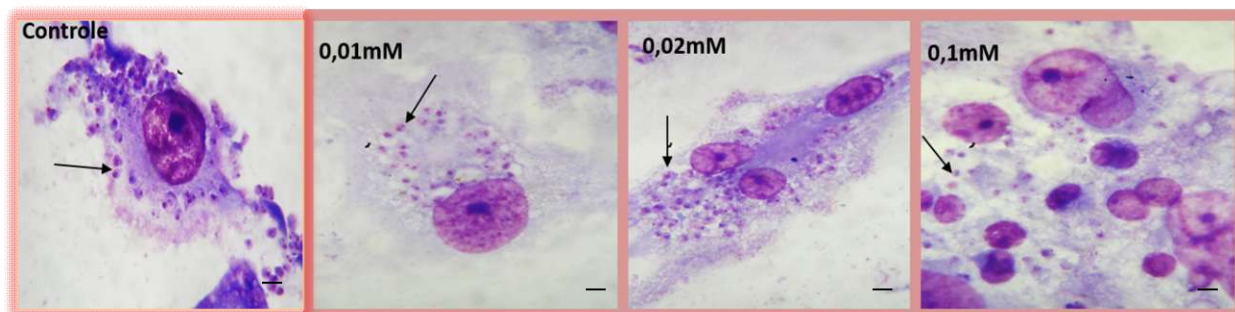


Figura 34. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol e recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM, 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,1 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares. Barra de escala 20 μ m.

A análise da percentagem de células infectadas com *Leishmania (L.) infantum* mostrou que a exposição a NP PLGA ITZ Manose nas concentrações mais baixas testadas (0,01 e 0,02 mM) não causaram alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na percentagem de células infectadas para todos os grupos de células contendo diferentes números de amastigotas por células em relação aos seus controles, células sem tratamento. No entanto, o tratamento com NPs contendo itraconazol a 0,1 mM causou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da percentagem de células com mais de 20 amastigotas por células, passando de 18,11% para 4,8%, enquanto que a percentagem de células com 1-10 amastigotas/células aumentou significativamente ($p < 0,001$) em relação ao controle, passando de 55,51% para 75,5%; a percentagem de células com 11-20 amastigotas/células não foi alterada significativamente em relação ao controle (**Figura 35**).

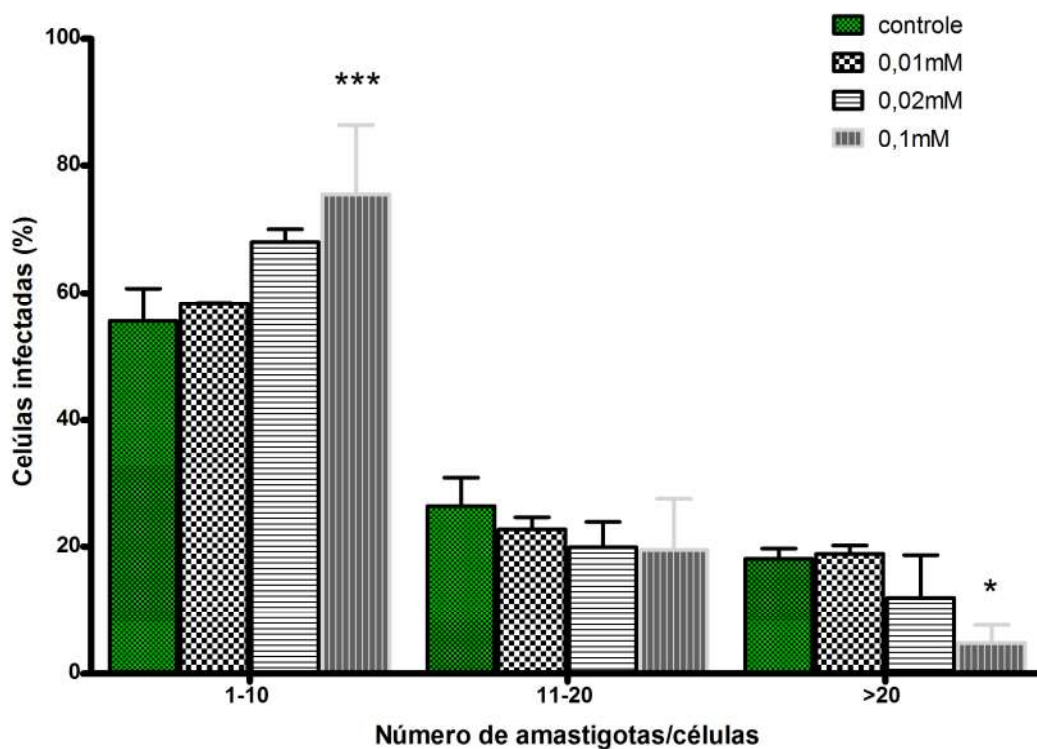


Figura 35. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania (L.) infantum* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM; 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. Os dados representam a média \pm desvio padrão. * estatisticamente significativo ($P < 0,05$) e *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

A atividade anti-leishmania de nanopartículas de PLGA com diferentes concentrações de itraconazol porém sem a cobertura de manose sobre células THP-1 transformadas e que foram infectadas com *L. (L.) infantum* foi maior na concentração de 0,2 mM de itraconazol, como observado a partir da presença reduzida de amastigotas intracelulares nesta condição quando comparado ao controle sem tratamento (**Figura 36**).

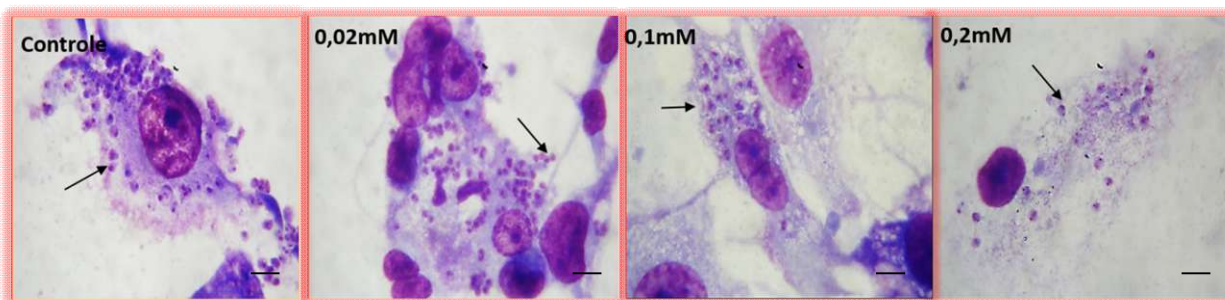


Figura 36. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania (L.)infantum* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM, 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,2 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares. Barra de escala 20 μ m.

A análise da percentagem de células infectadas com *Leishmania (L.)infantum* mostrou que a exposição a NP PLGA ITZ sem cobertura de manose tanto na concentração mais baixa testada (0,02 mM) quanto na maior concentração (0,2 mM) causaram diminuição estatisticamente significativa ($p > 0,001$) nas percentagens de células infectadas com mais de 20 amastigotas por células, passando de 18,12% para 8,4% e 8,3%, respectivamente; assim como aumento significativo ($p > 0,001$) das percentagens de células infectadas com 1-10 amastigotas por células, passando de 55,5% para 68,4% e 78,8%, respectivamente, sempre em relação aos seus controles. No entanto, a exposição a NP PLGA ITZ contendo 0,1 mM de itraconazol não causou alteração na percentagem de células infectadas para todos os grupos de células contendo diferentes números de amastigotas por células em relação aos seus controles, células sem tratamento (**Figura 37**).

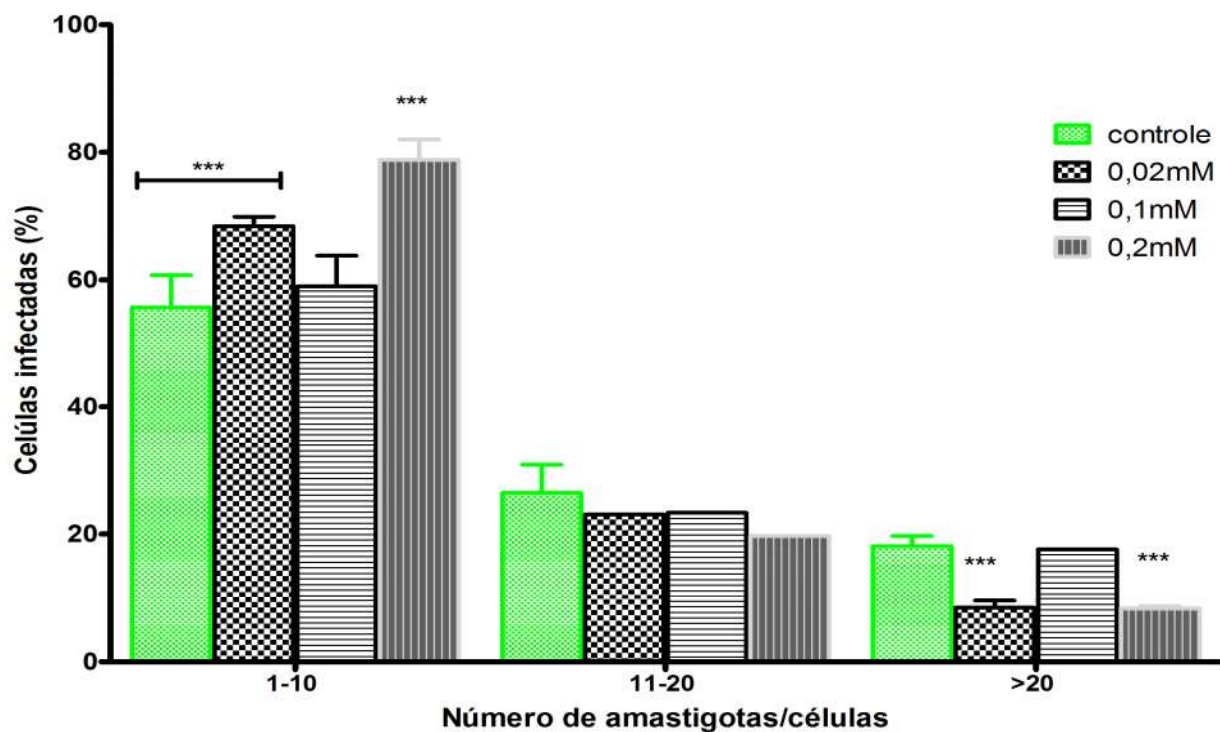


Figura 37. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania (L.) infantum* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM; 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

A atividade anti-leishmania de NP PLGA ITZ Manose sobre células THP-1 transformadas e que foram infectadas com *L. panamensis* foi evidente a medida que a concentração do fármaco aumentou, o que pode ser observado pela redução do número de amastigotas intracelulares presentes na célula em comparação ao grupo controle que não sofreu qualquer tratamento conforme ilustrado na **Figura 38**.

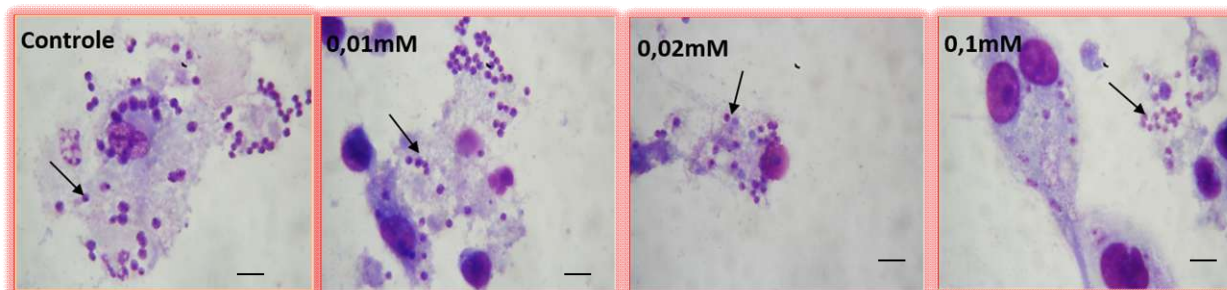


Figura 38. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania panamensis* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol e recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM, 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,1 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares. Barra de escala 20 μ m.

A análise células infectadas com *Leishmania panamensis* e expostas a diferentes concentrações de itraconazol em NP PLGA ITZ Manose não causaram alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nas percentagens de células infectadas com 1-10 amastigotas por células comparado ao controle, independente da concentração de itraconazol utilizada. No entanto, todas as concentrações de fármaco causaram diminuições significativas ($p < 0,05$) nas percentagens de células infectadas com mais de 20 amastigotas por células quando comparado ao controle, células sem tratamento, passando de 34,43% para 17,3%; 16,5% e 13,7% na exposição a 0,01 mM; 0,02 mM e 0,1 mM de itraconazol, respectivamente. A percentagem de células infectadas com 11-20 amastigotas por células sofreu um aumento significativo ($p < 0,01$) somente quando as células foram expostas a 0,1 mM de itraconazol, passando de 37,3% para 49,2% (**Figura 39**).

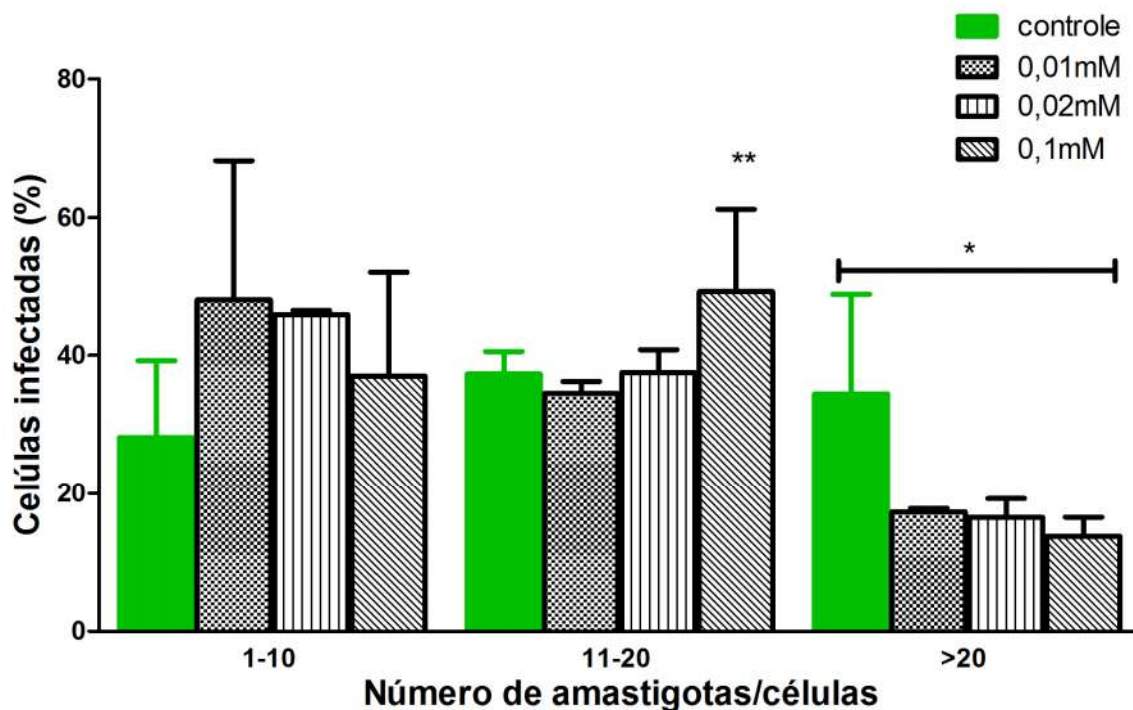


Figura 39. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania panamensis* de acordo como o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol recobertas com manose, em diferentes concentrações (0,01 mM; 0,02 mM e 0,1 mM) de itraconazol. Os dados representam a média \pm desvio padrão. * estatisticamente significativo ($P < 0,05$) e ** estatisticamente significativo ($p < 0,01$).

A atividade anti-leishmania de NP PLGA ITZ sem a cobertura de manose sobre células THP-1 transformadas e que foram infectadas com *L. panamensis* foi evidente a medida que a concentração do fármaco aumentou, o que pode ser observado pela redução do número de amastigotas intracelulares presentes na célula em comparação ao grupo controle que não sofreu qualquer tratamento conforme ilustrado na **Figura 40**.

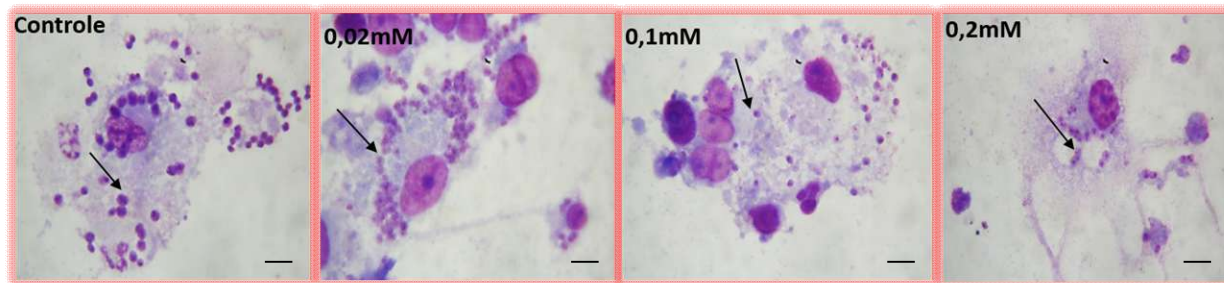


Figura 40. Fotomicrografias de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas com amastigotas de *Leishmania panamensis* tratadas ou não (controle) com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, em diferentes concentrações (0,02 mM, 0,1 mM e 0,2 mM) de itraconazol. A atividade anti-leishmania é maior na presença de 0,2 mM de itraconazol comparado ao controle. As setas indicam a presença dos amastigotas intracelulares. Barra de escala 20 μ m.

A análise de células infectadas com *Leishmania panamensis* mostrou que a exposição a NP PLGA ITZ sem cobertura de manose nas concentrações de itraconazol mais baixas testadas (0,02 e 0,1 mM) causaram diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) nas percentagens de células infectadas com mais de 20 amastigotas por células, passando de 34,43% para 16,4% e 4,6%, respectivamente; assim como aumento significativo das percentagens de células infectadas com 1-10 amastigotas por células, passando de 28,13% para 45,6% ($p < 0,01$) e 56,9% ($p < 0,001$), respectivamente, sempre em relação aos seus controles. As percentagens de células infectadas com 11-20 amastigotas por células não foram significativamente ($p > 0,05$) alteradas na exposição a estas concentrações de itraconazol. No entanto, a exposição a NP PLGA ITZ contendo 0,2 mM de itraconazol causou a diminuição significativa dos percentuais de células infectadas com 11-20 e com mais de 20 amastigotas por células, passando de 37,3% para 19,6% ($p < 0,01$) e 34,43% para 5,7% ($p < 0,001$), respectivamente, quando comparado aos seus controles. Assim como, houve um aumento significativo ($p < 0,001$) do percentual de células infectadas com 1-10 amastigotas por células quando comparado ao controle, passando de 28,13% para 74,5% (**Figura 41**).

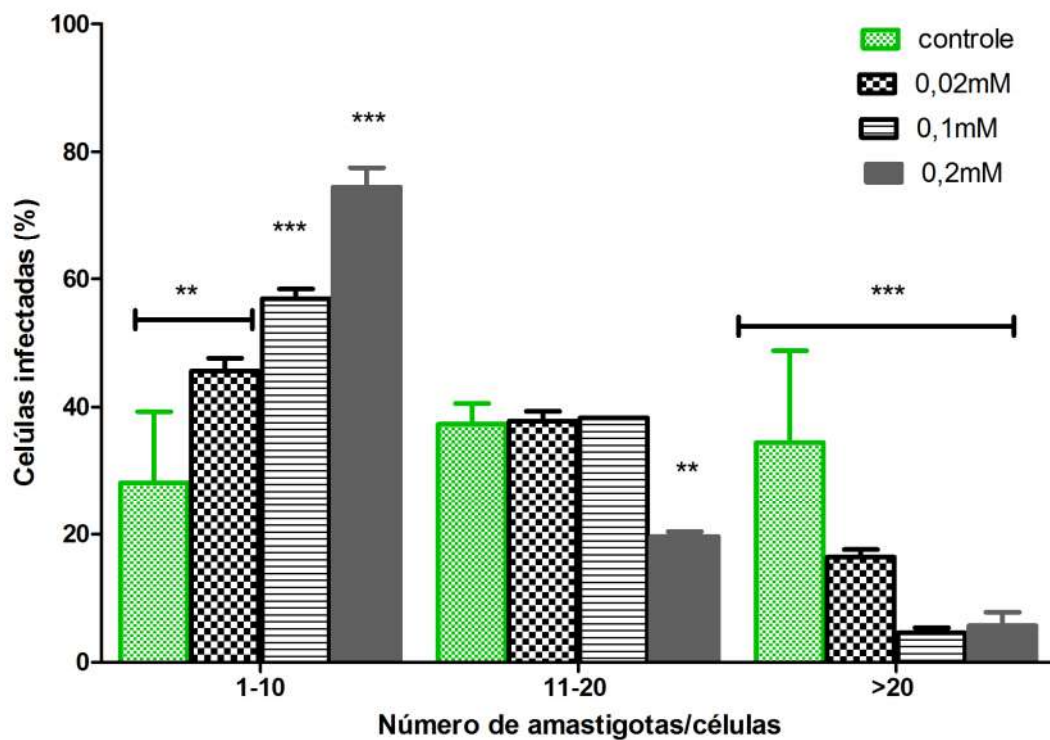


Figura 41. Percentagem de células THP-1 transformadas em macrófagos e infectadas por *Leishmania panamensis* de acordo com o número de amastigotas intracelulares por células (a/c) após 48 horas de tratamento com nanopartículas poliméricas de PLGA contendo itraconazol, representam a média \pm desvio padrão. ** estatisticamente significativo ($P < 0,01$) e *** estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

5. Discussão

Uma ampla variedade de fármacos têm sido utilizados para o tratamento da leishmaniose (Croft *et al.*, 2006). Devido a resistência do parasita e a baixa absorção de certos fármacos (Thakur *et al.*, 1993; PB Thakur *et al.*, 1996 ; Sundar *et al.*, 2002) faz-se necessário buscar outros sistemas de liberação como alternativa para minimizar os fatores acima mencionados. Atualmente, um exemplo de nanocarreador utilizado para carregar fármacos para tratar a leishmaniose consiste no uso de lipossomas. Uma formulação lipossômica comercialmente disponível no mercado e usada no tratamento da leishmaniose é a Ambisome® a base de Anfotericina B (MEYERHOFF *et al.*, 1999, ROY *et al.*, 2010).

A Ambisome® é eficaz contra a leishmaniose visceral (Croft, 2003). No entanto, esta formulação lipossomal apresenta efeitos colaterais e é instável quando exposta a temperaturas acima de 25 °C (Croft, 2003). Sabe-se que a leishmaniose é prevalente em regiões geralmente quentes. No presente estudo, verificou-se a ação anti-leishmania do itraconazol (agente antifúngico) nanoencapsulado, o itraconazol foi encapsulado em nanopartículas poliméricas de poli lático co-glicólico (PLGA), as quais foram cobertas com manose. O PLGA é um copolímero biodegradável que não é tóxico para o ser humano e é aprovado pela Food and Drug Association (FDA).

As nanopartículas (nanocápsulas) preparadas apresentaram diâmetro hidrodinâmico menor que 300 nm usando a técnica de nanoprecipitação. Estes dados corroboram com dados da literatura, onde o mesmo método foi usado pelos autores Panagi *et al.*, (2001) e Oster *et al.*, (2004) que relataram obter nanopartículas com um diâmetro médio menor que 200 nm, já outros autores utilizando o mesmo método relataram obter nanopartículas com um diâmetro médio maior que 300 nm (NIWA *et al.*, 1993; AMELLER *et al.*, 2003; PURI *et al.*, 2007).

Um dos papéis de encapsular fármacos em nanosistemas é para melhorar a entrega do fármaco no local específico, assim o tamanho das nanopartículas é um aspecto importante. Quanto menor as nanopartículas, maior é a área de superfície em relação ao volume (Zhang *et al.*,

2006). As nanopartículas produzidas no presente estudo apresentaram tamanhos adequados para serem testadas *in vitro* contra macrófagos.

Em termos de estabilidade, o potencial zeta é uma medida essencial (Ortega *et al.*, 2007), as nanopartículas de PLGA apresentaram potenciais zetas baixos ($-1,16 \text{ mV} \pm 1,0$) que se mantiveram estáveis durante um período de 60 dias, quando submetidas as temperaturas de 4°C e 37°C , enquanto que os autores Ameller *et al.*, (2003) e Saxena *et al.*, (2006) relataram nanopartículas de PLGA com potenciais zeta negativos altos. O potencial zeta negativo representa a carga de superfície das nanopartículas, o que equivale a repulsão eletrostática entre as nanopartículas (Soppimath *et al.*, 2001). Essa repulsão impede as nanopartículas em agregar-se.

Outros autores têm verificado o papel do surfactante em relação ao Potencial Zeta. Tem sido relatado que o surfactante pode mascarar a carga de superfície das nanopartículas e que o álcool polivinílico residual pode influenciar o potencial Zeta de nanopartículas de PLGA (Sahoo *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2013). Isto explicaria a alteração do Potencial Zeta das nanopartículas no sentido negativo, quando lidas no dia 60, em comparação com as leituras das nanopartículas após 24 horas. No presente trabalho, o PVA foi adotado como surfactante, acredita-se que surfactante residual de PVA eventualmente presente após as lavagens (processo para a remoção do PVA) das nanopartículas, influenciasse no Potencial Zeta das nanopartículas, tornado-as mais negativas.

Estas variações observadas tanto para o Potencial Zeta como para o tamanho podem ser explicadas devido ao tipo de solvente utilizado, fármaco, bem como o tipo de surfactante utilizado na preparação (Astete *et al.*, 2006). No entanto, no presente estudo não foram observadas variações em relação ao índice de polidispersidade (IPD), o que demonstra que essas nanopartículas possuem estabilidade e podem ser armazenadas durante um período de 60 dias sem sofrer alteração no IPD.

A influência da temperatura sobre nanopartículas têm sido investigada por Hyon e colaboradores (1995). A temperatura de transição vítrea (Tg) é um parâmetro crucial para a taxa de degradação dos polímeros. A Tg do PLGA é conhecida para temperaturas acima de 37 °C. Altas temperaturas tendem a acelerar a degradação hidrolítica de PLGA quando os mesmos são expostos a temperaturas superiores a 100 °C, no entanto, a 37 °C o co-polímero de PLGA pode permanecer intacto se misturado numa solução salina de tampão fosfato a pH 7,4 (Hyon *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2015). Conforme Weir *et al.*, (2004) e Fukushima *et al.*, (2011) dependendo da razão de polímero entre o PLA e PGA, 85:15 m/v (PLA:PGA) ou 50:50 (PLA:PGA), há uma variação do grau de degradação.

No presente trabalho as nanopartículas preparadas utilizando a proporção de co-polímero de PLGA (50:50) m/v (PLA:PGA) incubadas a temperatura de 37 °C, verificou-se agregação das nanopartículas, no entanto, as mesmas foram mais estáveis em tamanho quando incubadas a 4 °C em comparação com as mantidas a 37 °C, como a nanopartículas poliméricas foram expostas durante um longo período sob uma condição perto do (Tg), isso explicaria a instabilidade das nanopartículas a temperatura de 37°C.

O PLGA degrada-se por hidrólise das suas ligações éster em ambientes aquosos. A degradação ocorre em quatro etapas: 1) hidratação; a água penetra na região amorfa e quebra as forças de van der Waals e faz ligações de hidrogênio para provocar uma diminuição da temperatura de transição vítrea (Tg). 2) o segundo passo consiste na degradação inicial do polímero, através da clivagem de ligações covalentes (C-O) diminuindo a massa molecular do polímero. 3) o terceiro passo está na degradação constante; grupos carboxilos terminais são liberados da cadeia polimérica, essa liberação é causada pela clivagem da ligação covalente (C-C), sendo assim resultando na perda da integridade do polímero. 4) o quarto passo abrange a solubilização; os fragmentos formados (PLA-ácido láctico e PGA-ácido láctico) após a clivagem do PLGA são solúveis em água (Motta *et al.*, 2006).

A taxa de degradação é influenciada por um número de parâmetros. O primeiro é o peso molecular; os polímeros convencionais menores (10 a 20 kDa) degradam dentro de

semanas, enquanto os maiores (20 a 100 kDa) começam a degradar depois de vários meses. O ácido glicólico em relação ao ácido láctico possui mais chance de influenciar a taxa de degradação. Por sua vez, o ácido láctico tende a ser menos hidrófilico, o que implica que absorve menos água, dessa forma degrada lentamente (FARAHANI *et al*,2005).

O segundo parâmetro consiste que o grupo lateral metila do PLA faz com que a molécula seja mais hidrófoba em comparação ao PGA. O terceiro parâmetro é a estereoquímica, a mistura de monómeros de ácido láctico *D* e *L* são comumente usados na fabricação do PLGA. Em regiões amorfas do ácido láctico *D* e *L*, há um aumento da taxa de penetração de água o que resulta numa taxa acelerada de degradação do PLGA (FARAHANI *et al*,2005)

O grupo terminal de funcionalização é outro parâmetro importante, os polímeros que são selados com éster possuem um maior período de meia-vida em comparação com os polímeros que apresentam ácido carboxílico livre (Farahani *et al*,2005), os resultados obtidos no presente estudo demonstraram o contrário, as nanopartículas vazias (sem ITZ) cobertas com manose foram menos estáveis quando comparadas com as nanopartículas sem a cobertura do açúcar (manose) ao longo do período de 60 dias. As nanopartículas vazias cobertas com manose aumentaram em tamanho quando comparadas com as nanopartículas vazias sem o itraconazol ou manose. Acredita-se que a estabilidade de nanopartículas de PLGA está limitada as nanopartículas carregadas ou descarregadas com o itraconazol.

As nanoformulações foram testadas em relação à citotoxicidade a linhagens celulares de macrófagos. Parasitas *Leishmania* invadem macrófagos para desenvolverem-se em amastigotas intracelulares. Em um estudo realizado por Hart *et al.*, (1989), revelou que há uma baixa citotoxicidade da concentração 0,01 mM de itraconazol livre quando submetidas as linhagens de macrófagos THP-1 e J774G8. Além disso, outro estudo demonstrou citotoxicidade inferior do itraconazol em concentrações 0,02 mM *in vitro* contra macrófagos (Macedo *et al.*, 2013). Esses resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho, onde o percentual de células viáveis foi semelhante para células THP-1 e J774, respectivamente, ao testar o itraconazol livre nas mesmas concentrações.

Isto é devido ao fato de que o itraconazol inibe a síntese do ergosterol um esteroide comum em protozoários e células de fungos, enquanto que as células de mamíferos possuem colesterol (Zakai *et al.*, 2000). No presente trabalho, o itraconazol tanto nanoencapsulado ou livre apresentou citotoxicidade contra macrófagos murino J774, embora os macrófagos murino J774 apareceram mais sensíveis à droga livre em comparação com os macrófagos humanos THP 1.

Hart e colaboradores (1989) verificaram a atividade anti-leishmania do itraconazol livre em *Leishmania (L.) mexicana*. No presente trabalho, as nanoformulações de itraconazol foram capazes de apresentar atividade leishmanicida contra amastigotas. As nanoformulações preparadas com ou sem manose foram eficazes contra três tipos de cepas testadas; *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* e *L. panamensis* e apresentaram atividade anti-leishmania contra amastigotas semelhantemente aos resultados reportados por Khazaeli *et al.*, (2014), os quais desenvolveram um niossoma (sistema para entrega da droga) carregado com itraconazol para tratar amastigotas de *Leishmania tropica*. A explicação para isso as estirpes responderam de forma diferente, por exposição ao mesmo tratamento para qualquer promastigotas ou amastigotas de ensaio quer PLGA itraconazol coberto com manose ou itraconazol PLGA sem .A razão é que, após cada formar os parasitas são cultivadas em diferentes condições biológicas (Galgiani *et al.*, 1997). Enquanto os promastigotas extracelulares motilidade livres requerem meio de Schneider e 28 o C de incubação e as amastigotas exigem meio RPMI e 37 o C de incubação. Além disso, cada espécie tem tolerância diferente ao itraconazol, que estava entre observações de nossos resultados.

Os sistemas de entrega de drogas (*Drug Delivery Systems*) desempenham um papel na melhoria da eficácia em relação aos sistemas de drogas convencionais. Por meios convencionais, a absorção dos fármacos em macrófagos é por mecanismo passivo, enquanto que as nanopartículas entram por endocitose. Conforme Banerjee *et al.*, (1996) nanopartículas revestidas com moléculas de manose, aumenta a potência de entrega da nanoformulação. De fato, no presente trabalho foi verificado que o PLGA ITZ Manose em 0,1 mM conseguiu reduzir os números de amastigotas para *Leishmania leishmania infantum* em um percentual semelhante ao PLGA ITZ a 0,2 mM. Esta eficácia melhorada da nanoformulação manose é provavelmente devido à endocitose mediada pelo receptor, pois a manose liga-se aos receptores de manose dos

macrófagos na superfície e, portanto, resulta no aumento da captação. A vantagem de alvejar os receptores de manose, é que eles são excessivamente expressos em células infectadas (SINGODIA *et al.*, 2012).

Muitos estudos têm sido descritos nessa abordagem, levando em consideração os receptores de manose dos macrófagos na absorção de fármacos. A indolizina (uma droga insolúvel em água) em microesferas de PLGA ligada a manose mostra ser altamente eficiente contra leishmaniose visceral (Dutta *et al.*, 1994). Nahar & Jain (2012) verificaram que nanopartículas de PLGA ligada a manose e carregadas com Anfotericina B foram eficientes contra amastigotas *Leishmania donovani*.

No presente trabalho observou-se que a nanoestruturação do itraconazol associado a manose provou ser uma abordagem que depende da concentração do fármaco, pois as nanoformulações que apresentaram uma melhor eficácia foram as que continham uma menor concentração do fármaco em comparação com as nanopartículas sem manose.

6. Conclusão

Foi possível desenvolver uma nanoformulação polimérica revestida com manose contendo itraconazol que apresenta atividade anti-leishmania *in vitro*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania panamensis* a qual consegue reduzir parasitas leishmania e/ou macrófagos infectados pelo parasita em ensaios amastigotas. Outras investigações utilizando modelo animal são recomendadas para avaliar o potencial destas nanopartículas contra a leishmaniose.

7.Referências

- Albalasmeh AA, Berhe AA, Ghezzehei TA. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr Polym* 2013;97:253–61.
- Allemann E, Gurny R, Doelker E. Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm* 1993;39:173-91
- Allen, T.M., Martin, F.J., Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin. Oncol.* 2004;31, 5–15.
- Ameller, V. Marsaud, P. Legrand, R. Gref, G. Barrat, and J. Renoir, Polyester Poly (ethylene Glycol) nanoparticles loaded with the pure anti-estrogen RU 58668: Physicochemical and opsonization properties. *Pharmaceutical Research*, 2003; 20:7: 1063-1070
- Arana BA, Mendoza CE, Rizzo NR, Kroeger A. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:466-70.
- Asilian A, Jalayer T, Whitworth JA, Ghasemi RL, Nilforooshzadeh M, Olliaro P. A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53:648-51
- Astete, C. E., & Sabliov, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 2006;17:3; 247–289.
- Banerjee G, Nandi G, Mahato SB, Pakrashi a, Basu MK. Drug delivery system: targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:145–50.
- Baroni a., Aiello FS, Voza a., Voza G, Faccenda F, Brasiello M, et al. Cutaneous leishmaniasis treated with itraconazole. *Dermatol Ther* 2009; 22:27–9.

- Barragán P, López-Velez R, Olmo M, Podzamczar D. Visceral Leishmaniasis treated with antimonials/paromomycin followed by itraconazole/miltefosine after standard therapy failures in a human immunodeficiency virus-infected patient. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83:10–2.
- Bavarsad N, Fazly Bazzaz BS, Khamesipour A, Jaafari MR. Colloidal, in vitro and in vivo anti-leishmanial properties of transfersomes containing paromomycin sulfate in susceptible BALB/c mice. *Acta Trop* 2012; 124:33–41
- Bender AR, von Briesen H, Kreuter J, Duncan IB, Rubsamen- Waigmann H: Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiretroviral agents in human immunodeficiency virus- infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1467-1471
- Bogdan C. Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. *Ann Rheum Dis* 2012;71(Suppl 2):i60–6.27.
- Bryceson A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health* 2001; 6 : 928-34.
- Carrillo-conde, B. R., & Ramer-tait, A. E. polyanhydride nanoparticles target C-type lectin receptors on dendritic cells. *Mol. Pharmaceutics* 2011;8: 1877–1886
- Cools, M., Aerts, F., & Van Wauwe, J. Lack of immunosuppression by ketoconazole and itraconazole. *International Journal of Immunopharmacology*, 1992;14:6;1011–7.
- Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., Speiser, P Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 1979;31: 331–332.

- Croft SL, Vivas L, Brooker S. Recent advances in research and control of malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis and schistosomiasis. *East Mediterr Health J* 2003;9:518–33.
- Croft, S. L., Sundar, S., & Fairlamb, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Society*, 2006;19:1;111–126.
- Chen W, Gu B, Wang H, Pan J, Lu W, Hou H. Development and evaluation of novel itraconazole-loaded intravenous nanoparticles. *Int J Pharm* 2008; 362:133–40.
- Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64:640–65.
- Czerniawska A: Experimental investigations on the penetration of ¹⁹⁸Au from nasal mucous membrane into cerebrospinal fluid. *Acta Otolaryngol* 1970; 70:1:58-61
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 239–43
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol infect dis*; 2004; 27:305-18
- DeBeule, K., Itraconazole pharmacology, clinical experience and future development. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1995;6:175–181.
- Deane, L.M., Deane, M.P., 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 1962;4:149–212: 87.
- Dogra J and Jaxena V.N, Itraconazole and leishmaniasis; a randomized double blind trial in cutaneous disease. *International Journal for parasitology* 1996; 26:1413-1415.
- Dorsthorst DTA Te, Verweij PE, Meis JFGM, Punt NC, Mouton JW. In Vitro Interactions between Amphotericin B, Itraconazole, and Flucytosine against 21 Clinical *Aspergillus* Isolates Determined by Two Drug Interaction Models 2013;48:2007–13.

- Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int J Pharm* 2010; 387:187–98.
- Dutta M, Bandyopadhyay R, Basu MK. Neoglycosylated liposomes as efficient ligands for the evaluation of specific sugar receptors on macrophages in health and in experimental leishmaniasis. *Parasitology* 1994;109:2:139-47.
- East, L., Isacke, C. M. The mannose receptor family. *Biochim. Bio- phys. Acta* 2002;1572, 364–386.
- El-On J, Jacobs GP, Witztum E, Greenblatt CL. Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26:745-51
- El-On, J et al, Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2004;50; 6:15153918
- Faber WR, Hoekzema R, Bart A, Zeegelaar JE, de Vries HJC. Cutaneous leishmaniasis acquired in jura, france. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:183–4.
- Farahani TD, Entezami AA, Mobedi H, Abtahi M. Degradation of poly (D, L-lactide-co-glycolide) 50: 50 implant in aqueous medium. *Iran Polym J* 2005; 14:753–63.
- Faraji, A. H., & Wipf, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009;17:8; 2950–62.
- Fernandez-Guerrero ML, Aguado JM, Buzon L, Barros C, Montalban C, Martin T, Bouza E. Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. *Am. J. Med.* 1987; 83:1098-102
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., and Benita, S., Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int J Pharm*, 1989;55:1; 1-4
- Fromtling, R.A., *Recent Trends in the Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents*. J.R. Prous Science Publishers, Barcelona, Spain, pp. 1987; 233–249.

- Fukushima K, Tabuani D, Dottori M, Armentano I, Kenny JM, Camino G. Effect of temperature and nanoparticle type on hydrolytic degradation of poly (lactic acid) nanocomposites. *Polym Degrad Stab* 2011; 96:2120–9.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 2007;7:7.
- Godinho JLP, Simas-Rodrigues C, Silva R, Ürmenyi TP, De Souza W, Rodrigues JCF. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:326–31.
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V. & Langer, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 1994;263, 1600–3.
- Gupta A, Gupta RK, Gupta GS. Targeting cells for drug and gene delivery: Emerging applications of mannans and mannan binding lectins 2009; 68:465–83.
- Haley, B., Frenkel, E., 2008. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol. Oncol.* 2008; 26, 57–64
- Hamdy, S., Haddadi, A., Shayeganpour, A., Samuel, J., and Lavasanifar, A., Activation of antigen-specific T cell-responses by mannan-decorated PLGA nanoparticles. *Pharm Res* 2011; 28:9: 2288-301.
- Hart, D. T., Lauwers, W. J., Willemsens, G., & Bossche, H. Vanden. *Leishmania mexicana mexicana* infected macrophages 1989; 33, 123–134.
- He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Biomaterials Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 2010; 31:3657–66.
- Horst R, Collin SM, Ritmeijer K, Bogale A, Davidson RN. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clin Infect Dis* 2008;46:1702–9.

- Hughes G . Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine* 2005;1:22–30.
- Hyon SH, Jamshidi K, Ikada Y. *Polymers as biomaterials*. New York: Plenum; 1984. 51-65.
- Jain, R.K., Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *J. Control. Release* 1998;53, 49–67
- Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded Biomaterials. 2000;21;23:2475-90.
- Janknegt, R., de Marie, S., Bakker-Woudenberg, I.A., Crommelin, D.J, *Clin. Pharmacokinet. Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. Clinical pharmacokinetics.* 1992;23, 279–291.
- Kalter DC. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Prog Dermatol* 1989;23:1-1 I.
- Kansal S, Tandon R, Dwivedi P, Misra P, Verma PRP, Dube A, et al. Development of nanocapsules bearing doxorubicin for macrophage targeting through the phosphatidylserine ligand: a system for intervention in visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2650–60.
- Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World Leishmania Infections. *Dermatol Clin* 2015;33:579–93.
- Khatry s, Shastri N,M .S . Novel drug delivery systems for antifungal therapy 2010; 2:4–7.
- Khazaeli P, Sharifi I, Talebian E, Heravi G, Moazeni E, Mostafavi M. Anti-leishmanial effect of itraconazole niosome on in vitro susceptibility of *Leishmania tropica*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014;38:205–11.
- Kreuter, J., Nanoparticles and nanocapsules-new dosage forms in the nanometer range *Pharm. Acta Helv.* 1978;53:33–39
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 75:1–18.

- Larbi E.B, Al-Khawajah,A ,Al-Gindan,Y ,Jain S, Abahusain,A & Al-Zayer ,A (1995) A randomized ,double-blind, clinical trial of topical clotrimazole vs miconazole for treatment of cutaneous leishmaniasis In the Eastern province of Saudi Arabia .American Journal of Tropical medicine & Hygiene 1995 ;52: 166-168.
- Lane RP. Phlebotomine sandflies. In: Manson P, Cook GC, Zumla A, eds. Manson's Tropical diseases. 21st ed. London: Saunders, 2003:1733-41
- Leishmaniasis. Geneva, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2002 (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>, accessed 23 June 2004).
- Labhasetwar V, Song C, Levy RJ. Nanoparticles drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev 1997; 24:63-85.
- Lasic, D.D., 1998. Novel applications of liposomes. Trends Biotechnol. 16, 307–321
- Macedo-silva ST De, Urbina JA, Souza W De, Cola J. In Vitro Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against Leishmania amazonensis 2013;8.
- Maltezou HC, Siafas C, Mavrikou M, et al. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. Clin Infect Dis 2000;31(5):1139–43.
- Manandhar K Das, Yadav TP, Prajapati VK, Kumar S, Rai M, Dube A, et al. Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. J Antimicrob Chemother 2008; 62:376–80.
- Mangino, J.E., Pappas, P.G.,. Itraconazole for the treatment of histoplasmosis and blastomycosis. Int. J. Antimicrob. Agents 1995;5:219–225
- Marty et al, Nanoparticles – a new colloidal drug delivery system. Pharm Acta Helv. 1978; 53:17–23
- McConville MJ, Naderer T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of Leishmania. Annu Rev Microbiol 2011; 65:543–61.

- Meyerhoff A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1999; 28 : 42-8; discussion 49-51.66
- Mitra, M. A.K. Mandal, T.K. Chatterjee, N. Das, Targeting of mannosylated liposome incorporated benzyl derivative of Penicillium nigricans derived compound MT81 to reticuloendothelial systems for the treatment of visceral leishmaniasis, *J. Drug Target.* 13 2005;285–293.
- Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Treatment of cutaneous leishmaniasis with itraconazole. Randomized double- blind study. *Arch Dermatol* 1996; 132: 784–86.
- Motta a. C, Duek E a. R. Síntese, caracterização e degradação “*in vitro*” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Matéria (Rio Janeiro)* 2006;11:340–50.
- Müller, R.H., Olbrich, C., Solid lipid nanoparticles: phagocytic uptake, *in vitro* cytotoxicity and in vitro biodegradation. *Die Pharm.* 1999;61, 462–467
- Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002;54, 131–155.
- Muthu MS, Singh S. Targeted nanomedicines: Effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. *Nanomed* 2009;4:105-18.
- Nahar M, Jain NK. Preparation , Characterization and Evaluation of Targeting Potential of Amphotericin B-Loaded Engineered PLGA Nanoparticles 2009;26:2588–98
- Nahar M, Jain NK. Preparation, Characterization and Evaluation of Targeting Potential of Amphotericin B-Loaded Engineered PLGA Nanoparticles 2009;26:2588–98
- Nassiri-Kashani M, Firooz A, Khamesipour A. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of itraconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19: 80–83

- Napper C E, Dyson M H & Taylor M E, An extended conformation of the macrophage mannose receptor, *J Biol Chem*, 276 ;2001:14759-14766
- Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou and Y. Kawashima, Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with d,l-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J. Control. Rel.* 1993;25, 89
- Oster, M. Wittmar, F. Unger, L. Barbu-Tudoran, A. Schaper, and T. Kissel,. Design of amine-modified graft polyesters for effective gene delivery using DNAloaded nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 2004;21:6;927-931
- Owens DE, Peppas N, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2006;307:93–102.
- Owais and C. M. Gupta, Targeted drug delivery to macrophages in parasitic infections,” *Current Drug Delivery* 2005;2:4:311–318,
- Panyam J, Sahoo SK, Prabha S, Bargar T, Labhasetwar V. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int J Pharm* 2003;262:1–11.
- Panagi, Z., Beletsi, a, Evangelatos, G., Livaniou, E., Ithakissios, D. S., & Avgoustakis, K. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001;221:1-2; 143–52.
- Parveen S, Sahoo SK. Long circulating chitosan / PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur J Pharmacol* 2011; 670:372–83.
- Polonio T, Efferth T. Leishmaniasis : Drug resistance and natural products (Review) 2008:277–86.
- Pomel S, Cojean S, Loiseau PM. Targeting sterol metabolism for the development of antileishmanials. *Trends Parasitol* 2015; 31:5–7.

- Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro, AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2006;2:8–21.
- Py-Daniel, K. R., Junior, O. R. P., Cordova, C. M. I., Fascineli, M. L., Tedesco, A. C., & Azevedo, R. B. HPLC-FLD method for itraconazole quantification in poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles, plasma and tissue. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2014;25:4; 697–703.
- Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci* 2011;36:887–913.
- Sacks D, Anderson C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of Leishmania infection in mice. *Immunol. Rev.* 2004;201:225–38
- Salah, A.B., Ben Ismail, R., Amri, F., Chlif, S., Ben Rzig, F., Khar-rat, H., Hadhri, H., Hassouna, M., Dellagi, K., Investigation of the spread of human visceral leishmaniasis in central Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; 94:382–386.
- Saxena V, Sadoqi M, Shao J. Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green Biodistribution in healthy mice 2006;308:200–4..
- Singodia D, Verma A, Verma RK, Mishra PR. Investigations into an alternate approach to target mannose receptors on macrophages using 4-sulfated N-acetyl galactosamine more efficiently in comparison with mannose-decorated liposomes: an application in drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2012; 8:468–77.
- Soflaei S, Dalimi A, Ghaffarifar F, Shakibaie M, Shahverdi AR, Shafiepour M. *In vitro* antiparasitic and apoptotic effects of antimony sulfide nanoparticles on *leishmania infantum*. *J Parasitol Res* 2012;2012.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., and Rudzinski, W.E., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 2001; 70;1-2:1- 20

- Soto, J. M., J. T. Toledo, P. Gutierrez, M. Arboleda, R. S. Nicholls, J. R. Padilla, J. D. Berman, C. K. English, and M. Grogil. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002;66:147–151.
- Speiser, P., Birrenbach, G., (1977). In United States Patent 4,021,364 Speiser; Prof. Dr. Peter (Forch, CH), USA.
- Speiser P. New drug formulations as the result of recent technological development efforts. *Act Pharm Suec.* 1973; 10:381–400
- Srivastava VP, Kumar S, Tripathi SO. PLGA Based Nanoparticle: Best tool for Treatment of Visceral Leishmaniasis 2013;3.
- Stevanović M, Savić J, Jordović B, Uskoković D. Fabrication, *in vitro* degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 59:215-23
- Sundar S., Jha T.K., Thakur C.P. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 2002;347 1739–1746.
- Sundar S et al. Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. *Clinical infectious diseases*, 2003, 37:6:800–4.
- Sundar S, More DK ,Singh MK .Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the centre of the Indian epidemic clin.infect.Dis 2000; 31:4:1104-7.
- Taylor, P. R., Gordon, S., Martinez-Pomares, L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 2005;26, 104–110.
- Thakur, C. P., Sinha, G. P., Pande, A. K., Barat, D. & Sinha, P. K. Amphotericin B in resistant kala-azar in Bihar. *National Medical Journal of India*, 1993;6:57-60.
- Thakur, C. P., Pandey, a K., Sinha, G. P., Roy, S., Behbehani, K., & Olliaro, P. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome(R))

for visceral leishmaniasis in India: A randomized dose-finding study. *Trans.R.Soc Trop Med Hyg*, 1996;90:3;319–322.

- Thakur CP et al. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999;93:3:319–23.
- Van de Ven H, Vermeersch M, Matheussen a, Vandervoort J, Weyenberg W, Apers S, et al. PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin β -aescin: factor influence study and in vitro efficacy evaluation. *Int J Pharm* 2011; 420:122–32.
- Vannier-Santos, M.A , Urbina J.A, Martiny A, Neves A& Souza W Alteration induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in leishmania. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1995; 42:337-346
- Weir NA, Buchanan FJ, Orr JF, Farrar DF, Dickson GR. Degradation of polyL lactide. Part 2: increased temperature accelerated degradation. *Proc IME H J Eng Med* 2004;218:5:321-30.
- Weyhers, H., Ehlers, S., Hahn, H., Souto, E.B., Muller,R.H.,. Solid lipid nanoparticles (SLN)—effects of lipid composition on in vitro degradation and in vivo toxicity. *Pharmazie* 2006;61, 539–544
- Willems L, Geest R Van Der, Beule K De. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics 2001.
- Wu G, Zhou F, Ge L, Liu X, Kong F. Novel Mannan-PEG-PE Modified Bioadhesive PLGA Nanoparticles for Targeted Gene Delivery. *J Nanomater* 2012; 1–9.
- World Health Organization (WHO), Control of the leishmaniasis, Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, WHO Technical Report Series 949, Geneva. 2013; 949:1-187
- Yalcin M. Tetraiodothyroacetic acid (Tetrac) and Nanoparticulate Tetrac arrest growth of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009;95:4

- Zakai H a, Zimmo SK. Effects of itraconazole and terbinafine on *Leishmania major* lesions in BALB/c mice. Ann Trop Med Parasitol 2000;94:787–91.
- Zhang Z and S. S. Feng, Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: synthesis, formulation, characterization and *in vitro* drug release. Biomaterials 2006;27, 4025
- Zhu X, Braatz RD. A mechanistic model for drug release in PLGA biodegradable stent coatings coupled with polymer degradation and erosion. J Biomed Mater Res A 2015;103:2269–79.