



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**NARA KANZAKI**

**USO DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS COMO FORMA DE  
AVALIAR FORMULAÇÕES DE ANFOTERICINA B  
INOVADORAS**

**Orientadora: Profa. Dra. Ingrid Távora Weber**

**Co-orientadora: Profa. Msc. Carime Vitória da Silva Rodrigues**

**BRASÍLIA – DF**

**2019**

**NARA KANZAKI**

**USO DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS COMO FORMA DE AVALIAR  
FORMULAÇÕES DE ANFOTERICINA B INOVADORAS**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Farmácia.

**Orientadora: Profa. Dra. Ingrid Távora Weber**

**Co-orientadora: Profa. Msc. Carime Vitória da Silva Rodrigues**

**BRASÍLIA – DF**

**2019**

**NARA KANZAKI**

**USO DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS COMO FORMA DE AVALIAR  
FORMULAÇÕES DE ANFOTERICINA B INOVADORAS**

Monografia apresentada ao curso de graduação em  
Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito  
parcial para obtenção de título de Bacharel em Farmácia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ingrid Távora Weber  
(IQ/Universidade de Brasília)

---

Profa. Msc. Carime Vitória da Silva Rodrigues  
(IQ/Universidade de Brasília)

---

Prof. Dr. Jefferson Bruno Pereira Ribeiro  
(Membro avaliador)

**BRASÍLIA – DF**

**2019**

Dedico à minha mãe Sandra Monteiro (*in memoriam*) que sempre cultivou a minha curiosidade, instigando-me pela busca do saber.

## AGRADECIMENTOS

Às minhas famílias, avós e avô, meus 8 irmãos, madrinha, primos e primas, tios e tias e sobrinhas pela torcida.

Ao meu pai, pelos conselhos, conversas descontraídas, por ser meu revisor número um e pelos ensinamentos dentro e fora de sala de aula. Quem diria que eu sobreviveria a duas disciplinas com ele em um mesmo semestre?!

Aos meus amigos da graduação, dos estágios, do jiu-jitsu e da vida, os quais tornaram minha vida acadêmica e/ou pessoal mais animada e prazerosa.

À minha orientadora, profa. Dra. Ingrid Távora Weber, por ter aceitado me orientar.

À minha coorientadora, Msc. Carime V. S. Rodrigues, a qual está junto de mim (ou eu estou junto dela) praticamente desde que entrei na UnB, ela me iniciou na vida científica e ainda se tornou uma das minhas melhores amigas.

Ao prof. Dr. Sacha Braun que colaborou com os experimentos desde o início até a análises das lâminas.

Aos colegas e amigos que fiz no LIMA/IQ/UnB, aprendi muito com eles sobre a vida científica e me diverti muito com os papos mais aleatórios possíveis, e não esquecerei do “Oh Nara!”. Alguns deles viraram parceiros no jiu-jitsu, que deu mais adrenalina e diversão na minha vida.

Ao meu ex-orientador de PIBITI, prof. Dr. Marcelo O. Rodrigues, o qual me aceitou como graduanda de IC no LIMA em 2015 e me ensinou tanto na sala de aula como no laboratório, e também no tatame. Não sabia se ele queria tornar minha vida fácil ou difícil, sei que aprendi bastante, mesmo apanhando às vezes.

Aos professores da Farmácia e de outros cursos pelos ensinamentos que passaram a mim na graduação.

Aos profissionais que conheci nos meus estágios obrigatórios, farmacêuticos ou não, aprendi muito sobre a atuação do farmacêutico, sobre a vida profissional e sobre a vida em si.

Aos profissionais que conheci no SEPLAB/INC/PF, me ensinaram muito sobre a atuação do farmacêutico nas ciências forenses e ainda deixaram meus dias mais divertidos no estágio.

À UnB, pela oportunidade de fazer uma graduação, à CAPES, pelas bolsas de PIBITI, e aos Laboratórios Sabin pelos exames bioquímicos.

A aqueles que me entenderam quando disse que estava ocupada com TCC.

Muitíssimo Obrigada! ありがとう ございます(Arigatoo gozaimasu)! Thank you very much! Muchísimas gracias!

“É dentro de você que o Ano-Novo  
cochila e espera desde sempre.”

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

A anfotericina B é um antifúngico de amplo espectro e leishmanicida que tem como mecanismo de ação a ligação ao ergosterol culminando na formação de canais na membrana do patógeno e conseqüente morte celular. Esse antifúngico e leishmanicida vem sendo usado há mais de cinquenta anos, considerado tratamento padrão para muitas doenças, dentre as quais, as negligenciadas como a leishmaniose. Apesar de ser medicamento padrão ou de segunda linha para muitas doenças, possui muitos efeitos adversos, dentre os quais, a nefrotoxicidade. Contudo, dependendo da formulação usada, a toxicidade renal é variável. A Fungizone<sup>®</sup>, a primeira a ser desenvolvida, possui maior toxicidade que a AmBisome<sup>®</sup>, que é recomendada por a ONU para muitas doenças negligenciadas. Apesar dessa formulação ser menos tóxica, ela apresenta valor de custo elevadíssimo o que inviabiliza como forma de tratamento para as populações mais carentes. Tendo em vista essa problemática da toxicidade de uma e do elevado custo da outra, muitos grupos de pesquisas vêm estudando novas formulações que sejam eficazes e menos tóxicas, como a formulação Anf@C-Dots, solúvel em água, a qual foi desenvolvida no Laboratório de Inorgânica e Materiais (LIMA) do Instituto de Química da UnB. Essa formulação foi testada em experimento pré-clínico e está em processo de registro de patente. Realizou-se experimento pré-clínico com camundongos Balb/c em que dentre os parâmetros avaliados incluem-se as diferenças de nefrotoxicidade entre as formulações que foi o objetivo deste trabalho. Os animais foram divididos em 6 grupos, três deles foram tratados com as três formulações citadas, um com C-Dots e os outros consistiam em grupos controles. Após 10 dias de tratamento, os camundongos foram eutanasiados e tiveram coletados o pulmão, baço, fígado e rins. Neste trabalho foram preparadas lâminas para análises histopatológicas da estrutura renal, enfocando-se particularmente nos Túbulos Contorcidos Distais e glomérulos, estruturas nas quais é possível detectar o desenvolvimento da Necrose Tubular Aguda, decorrente de danos nos túbulos e isquemia glomerular. O resultado das análises histopatológicas não indicou toxicidade renal para a formulação AnB@C-Dots, Fungizone<sup>®</sup> e AmBisome<sup>®</sup> e para os C-Dots. Para melhor caracterização de possível toxicidade da formulação ensaiada, serão realizadas análises histopatológicas de outros órgãos e testes de toxicidade aguda.

Palavras chaves: Anfotericina B, histopatologia, nefrotoxicidade.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular da Anfotericina B .....	1
<b>Figura 2:</b> Farmacoterapia com as formulações de AnB@C-Dots, Fungizone <sup>®</sup> e AmBisome <sup>®</sup> .....	2
<b>Figura 3:</b> Frasco-ampola da formulação lipossomal de anf B, a AmBisome <sup>®</sup> . .....	2
<b>Figura 4:</b> Estado de endemicidade para Leishmaniose no mundo em 2016. ....	5
<b>Figura 5:</b> Média de incidência de casos de Leishmaniose cutânea nas Américas no triênio de 2015 - 2017. ....	5
<b>Figura 6:</b> Esquema do método da histologia. ....	11
<b>Figura 7:</b> Córtex renal de um representante do grupo 1, tratado com AnB@C-Dots. Aumento de 60x e as setas indicam glomérulos. ....	13
<b>Figura 8:</b> Córtex renal de um representante do grupo 2, tratado com Fungizone <sup>®</sup> . Aumento de 60x e as setas indicam glomérulos. ....	14
<b>Figura 9:</b> Córtex renal e parte da medula renal de um representante do grupo 3 tratado com AmBisome <sup>®</sup> . Aumento de 40x, os sinais de raio indicam glomérulos e as setas os túbulos coletores. ....	15
<b>Figura 10:</b> Córtex renal de um representante do grupo 4. Aumento de 60x, as setas indicam os glomérulos e os sinais de raios indicam os TCD.....	16
<b>Figura 11:</b> Córtex renal de um representante do grupo 5 (A), controle positivo, e do grupo 6, controle negativo (B). Aumento de 40x (A) e aumento de 60x (B), setas indicam glomérulos e sinais de raios indicam TCD.....	17
<b>Figura A1:</b> Declaração do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) aprovando o uso de camundongos no estudo deste trabalho. ....	26



## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Farmacoterapia com as formulações de AnB@C-Dots, Fungizone® e AmBisome®. ....	10
<b>Tabela 2:</b> Método de coloração H&E. ....	12

## **LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS**

Anf B – Anfotericina B

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

C-Dots – Carbon Dots

CMED – Câmara de Regulao do Mercado de Medicamentos

IRA – Injúria Renal Aguda

IFI – Infeces Fúngicas Invasivas

H&E – Hematoxilina e Eosina

LRA– Lesão Renal Aguda

NTA– Necrose Tubular Aguda

ONU (em inglês WHO) – Organizao das Naes Unidas

OPAS (em inglês PAHO)– Organizao Pan-Americana de Saúde

TCD– Tbulo Contorcido Distal

TCP– Tbulo Contorcido Proximal

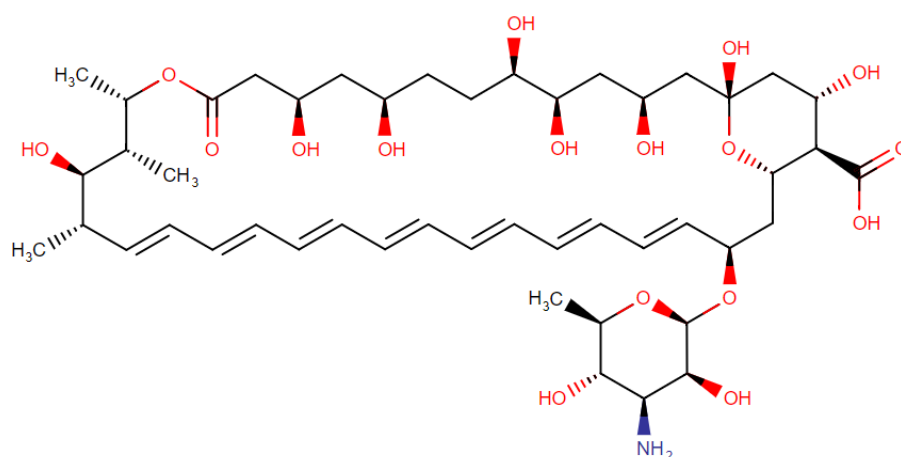
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>9</b>
<b>4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na década de 1950 foi isolada da espécie *Streptomyces nodosus* a molécula de anfotericina B (anf B) (Figura 1), a qual é um macrolídeo poliênico que possui atividade antifúngica de amplo espectro e atividade leishmanicida (AVERSA *et al.*, 2017; LANZA *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2014). Esse princípio ativo insolúvel em água, precisa estar em solução ausente de eletrólitos para não precipitar, dessa forma o solvente ou diluente é água para injetáveis (FANOS, CATALDI, 2000; KDIGO, 2012; MAYER *et al.*, 2002; PUBCHEM, 2019).

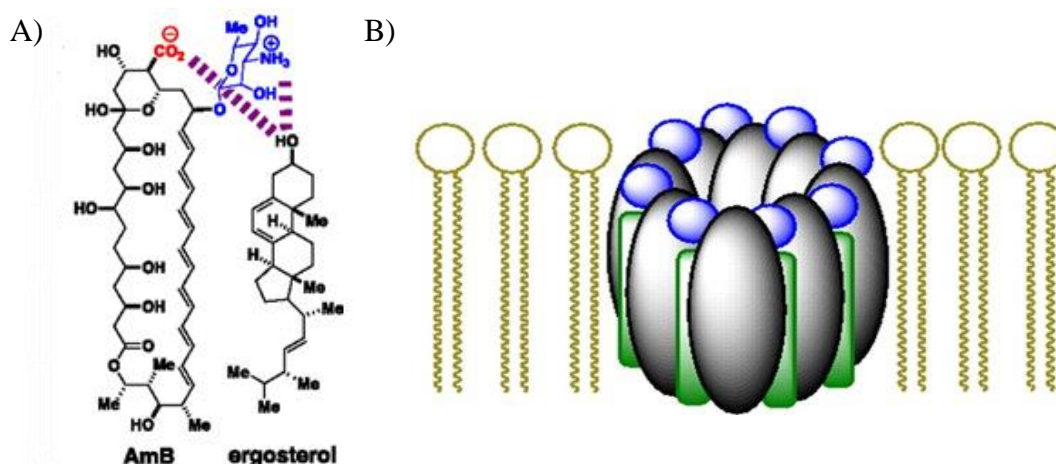
Figura 1: Estrutura molecular da Anfotericina B.



Fonte: (DRUGBANK.CA, 2019)

O seu mecanismo de ação deve-se a sua ligação com o ergosterol presente na membrana celular desses patógenos, formando canais que causam extravasamento celular de eletrólitos levando à morte celular. Na Figura 2 está representada a ligação da anf B com o ergosterol e a formação do canal na membrana celular. Um de seus mecanismos de toxicidade está diretamente ligado ao seu mecanismo de ação, pois, o princípio ativo liga-se ao colesterol presente em células de mamíferos também. O outro mecanismo de toxicidade é a vasoconstrição de arteríolas aferentes dos glomérulos renais. Apesar de os efeitos adversos serem conhecidos, o processo em si do mecanismo de ação ainda não foi completamente esclarecido (AVERSA *et al.*, 2017; FANOS, CATALDI, 2000; LANZA *et al.*, 2019; PALACIOS *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2014).

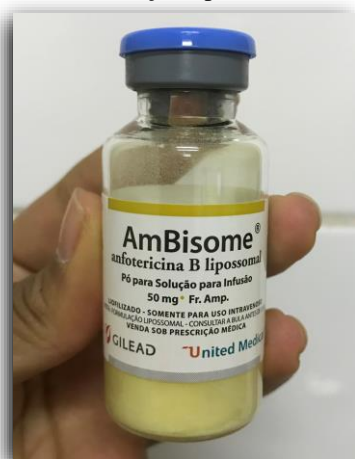
Figura 2: Ligação da anf B com o ergosterol - A) anfotericina B interagindo com ergosterol. B) Complexo anfotericina B e ergosterol formando canais na membrana plasmática.



Fonte: Adaptado (PALACIOS *et al.*, 2011)

Tendo em vista a sua toxicidade, foram criadas diferentes formulações como tentativas de contornar esse problema, a formulação mais antiga é a de anf B com desoxicolato, a Fungizone<sup>®</sup>. Na década de 1990 foi desenvolvida a formulação lipossomal AmBisome<sup>®</sup> (Figura 3) a qual se mostrou menos tóxica, e em seguida outras formulações lipossomais foram desenvolvidas, entretanto não apresentaram a mesma eficiência e menor toxicidade (ADLER-MOORE, GANGNEUX, PAPPAS, 2016; AHMED, BROCCINI, CROFT, 2012; LANZA *et al.*, 2019). Devido a diferença de toxicidade, as formulações de desoxicolato e de lipossomos não são intercambiáveis entre si, por exemplo, para a leishmaniose mucocutânea, a dosagem da Fungizone<sup>®</sup> é de 0,5 a 1 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> e a dose cumulativa é entre 20-45 mg.kg<sup>-1</sup> enquanto que a dosagem de AmBisome<sup>®</sup> é de aproximadamente 3 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> e dose cumulativa entre 20 e 60 mg.kg<sup>-1</sup> (ARONSON, HERWALDT, LIBMAN, 2016; CHAVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2015; DNDi, 2017; FOLK *et al.*, 2017).

Figura 3: Frasco-ampola da formulação lipossomal de anf B, a AmBisome<sup>®</sup>.



Fonte: Fotografia disponibilizada pelo Hospital das Forças

A diferença de toxicidade das formulações de desoxicolato de sódio para as formulações lipossomais, principalmente a AmBisome<sup>®</sup>, deve-se a presença de colesterol na membrana bilipídica dos lipossomas, pois, a anf B possui maior afinidade ao ergosterol, portanto ficará ligado ao esteroide do lipossoma e só deixará de interagir com essa molécula por outra de maior afinidade. Assim, a toxicidade da formulação lipossomal é menor, pois as moléculas de colesterol das células de mamíferos interagem menos com a anf B (CZUB, BAGINSKI, 2006; NEUMANN, WIECZOR, ZIELINSKA *et al.*, 2016).

Existem várias formulações de anf B - Fungizone<sup>®</sup>, AmBisome<sup>®</sup>, Fungisome<sup>®</sup>, Albecet<sup>®</sup>, Anforincin B<sup>®</sup>, dentre outras - as quais não são intercambiáveis entre si, já que apresentam níveis de toxicidade diferentes, e a diferença de nefrotoxicidade é fator importante cuja influência impacta na eficiência do tratamento e na posologia (CHAVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2015; DNDi, 2017; FOLK *et al.*, 2017). A menor toxicidade da anf B decorre da ligação do princípio ativo ao colesterol nos lipossomas, reduzindo assim a interação da anf B com o colesterol das células epiteliais dos túbulos renais (AHMED, BROCCINI, CROFT, 2012; AZANZA, SÁDABA, REIS, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2018).

Os efeitos adversos decorrentes do uso da primeira formulação de anf B, a Fungizone<sup>®</sup>, demandou o protocolo de medicação para contornar esses danos. Haveria necessidade de ser administrado antipirético, como paracetamol, e anti-inflamatórios não esteroidais, e a infusão deveria ser lenta, o paciente deveria ser bem hidratado e dependendo da reação do paciente, administrar-se-ia um corticoide, como hidrocortisona (FANOS, CATALDI, 2000; KDIGO, 2012; MAYER *et al.*, 2002). Assim, quando foi desenvolvida a formulação lipossomal houve significativa mudança, pois, a eficácia melhorou e a toxicidade caiu drasticamente, porém a dosagem a ser usada é maior e o custo muito elevado (AVERSA *et al.*, 2017; AZANZA, SÁDABA, REIS *et al.*, 2015; SUNDAR, CHAKRAVARTY, 2010).

Um dos principais efeitos tóxicos causados pela anf B é a nefrotoxicidade. Muitos trabalhos, como o de Aversa e colaboradores (2017), relatam alterações renais atestadas em exames bioquímicos e análises histopatológicas. Os níveis séricos de creatinina e eritropoietina encontram-se abaixo do nível de referência, e em análises de cortes histológicos de rins percebe-se danos nos Túbulos Contorcidos Distais (TCD) e também alterações glomerulares, acarretando em Lesão Renal Aguda (LRA) (AVERSA *et al.*, 2017; KDIGO, 2012; MAYER *et al.*, 2002; PATZER, 2008).

A toxicidade da anf B pode ser avaliada em experimentos *in vivo*, por análises histológicas, como em estudos em camundongos Balb/c. Nesses animais observa-se em cortes histológicos de rim a nível macroscópico, a formação de depósitos de colágeno, caracterizando fibrose renal devido à injúria causada pela medicação (FOLK *et al.*, 2017; MAYER *et al.*, 2002), em decorrência da formação de poros nas membranas das células epiteliais tubulares com conseqüente morte celular (ADLER-MOORE, GANGNEUX, PAPPAS, 2016; AZANZA, SÁDABA, REIS, 2015; SOUZA *et al.*, 2018).

Os danos histológicos nos rins causados pela anf B variam muito dependendo da formulação. A mesma concentração de diferentes formulações não causa o mesmo dano, mostrando a não intercambialidade das formulações (ADLER-MOORE, GANGNEUX, PAPPAS, 2016; AZANZA, SÁDABA, REIS, 2015). Apesar do avanço que houve com o desenvolvimento da AmBisome<sup>®</sup>, existem muitos estudos procurando desenvolver formulações de anf B menos tóxicas e de menor custo, pois, esse medicamento é muito utilizado em doenças negligenciadas (LANZA *et al.*, 2019; DNDi, 2017; WHO, 2015).

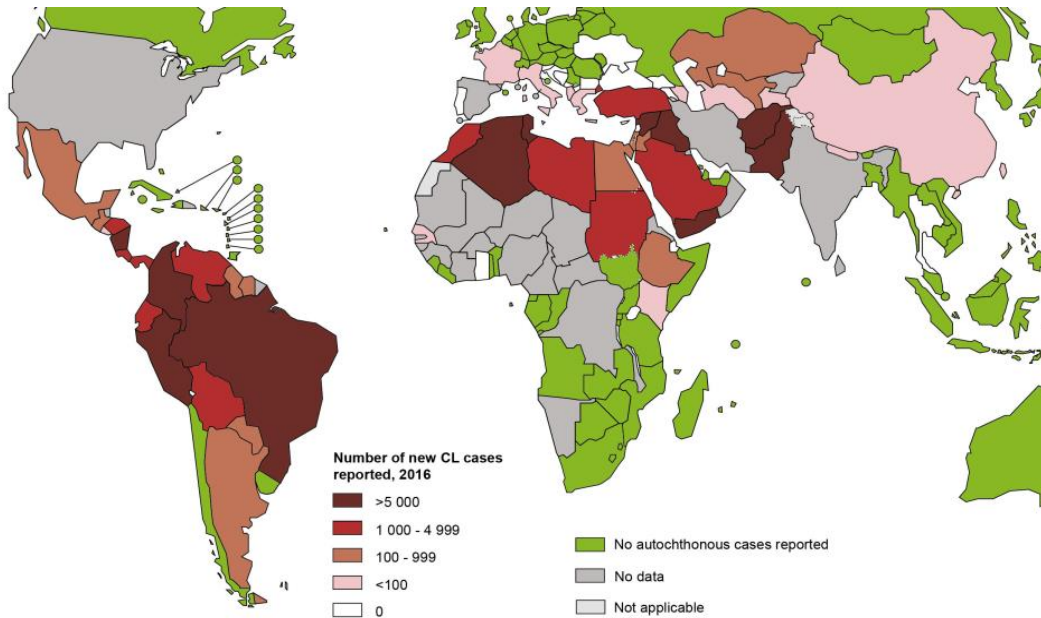
A maioria das doenças para as quais a anf B é usada são doenças negligenciadas, como as leishmanioses, e ainda em coinfeção com HIV (do inglês, Vírus da Imunodeficiência Humana), as Infecções Fúngicas Invasivas (IFI) como a candidíase invasiva, a histoplasmose disseminada, a aspergilose que também são comuns em imunocomprometidos (ADLER-MOORE, GANGNEUX, PAPPAS, 2016; AHMED, BROCCCHINI, CROFT, 2012; AVERSA *et al.*, 2017; BERN *et al.*, 2006).

A Organização das Nações Unidas (ONU) recomenda a AmBisome<sup>®</sup> como farmacoterapia, contudo também incentiva que haja estudo para o desenvolvimento de novas medicações, o que tem estimulado bastante pesquisas com esse princípio ativo (BERN *et al.*, 2006; DNDi, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2014). Encontrar novas moléculas para desenvolver novas medicações leva muito tempo, por isso muitos grupos de pesquisa procuram desenvolver novas formulações de moléculas de modo que a nova formulação tenha menor custo (AHMED, BROCCCHINI, CROFT, 2012; LANZA *et al.*, 2019; ROCHELLE *et al.*, 2018; WHO, 2015).

O Brasil é um dos países com maior incidência de leishmaniose, tanto a visceral quanto as cutânea e mucocutânea. Conforme os dados divulgados pela ONU sobre os casos reportados de leishmania em 2016 (Figura 4), a leishmaniose mucocutânea é endêmica no

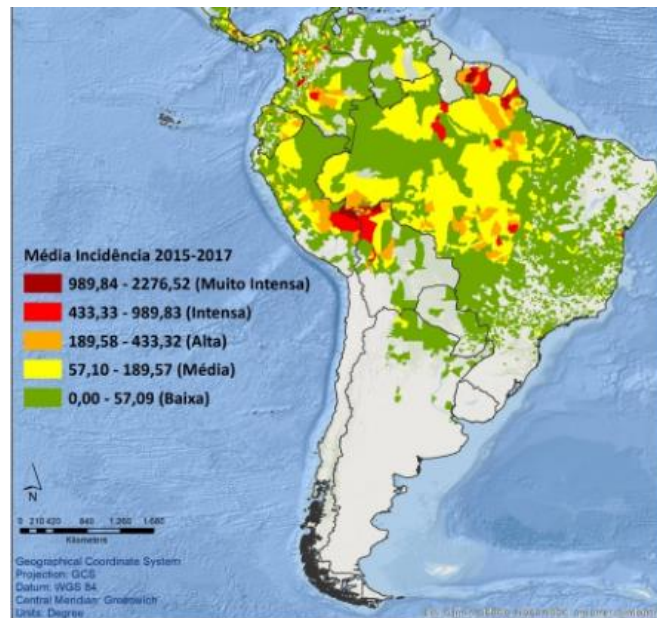
país e o número de casos reportados são os mais altos do mundo (OPAS/WHO, 2019; PAHO, 2019), com ênfase até 2017 nas regiões do Centro-Oeste e Norte como pode-se perceber na Figura 5 (OPAS/WHO, 2019).

Figura 4: Estado de endemicidade para Leishmaniose no mundo em 2016.



Fonte: Adaptado (OPAS/WHO, 2019).

Figura 5: Média de incidência de casos de Leishmaniose cutânea nas Américas no triênio de 2015 - 2017.



Fonte: Adaptado (OPAS/WHO, 2019).

Para as leishmanioses mucocutâneas, como a causada pela *Leishmania (V) brasiliensis*, é recomendada a terapia sistêmica, de preferência com a anf B lipossomal. Apesar de geralmente haver tratamento tópico para as formas cutâneas da doença, é



recomendado ainda o AmBisome<sup>®</sup> visto que os parasitas circulam pela linfa e pelo sangue, alcançando os tecidos nasofaríngeos (BERN *et al.*, 2006; ARONSON, HERWALDT, LIBMAN, 2016; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018).

No Brasil, os preços dos medicamentos são controlados pela Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED) que é um órgão interministerial responsável pela regulação econômica do mercado de medicamentos e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que exerce o papel de Secretaria-Executiva da CMED. Segundo a Lista de Preços máximos divulgada no site da ANVISA, um frasco-ampola de AmBisome<sup>®</sup> de 50 mg é vendido a preço de fábrica por R\$ 15.330,66 (quinze mil e trezentos e trinta reais e sessenta e seis centavos) e um frasco-ampola de Anforicin B<sup>®</sup> (formulação com desoxicolato de sódio) de 50 mg da Cristália é vendido a preço de fábrica por R\$ 20,74 (vinte reais e setenta e quatro centavos) (ANVISA, 2019). Mesmo sendo a AmBisome<sup>®</sup> a recomendação de tratamento para muitas doenças negligenciadas, acaba tornando-se economicamente inviável, pois muitas pessoas acabam padecendo por não conseguirem tratar-se. Por isso é grande o incentivo da ONU para que sejam produzidas formulações mais econômicas, acessíveis à população.

Um exemplo de estudos de desenvolvimento de novas formulações é a que vem sendo realizada no Laboratório de Inorgânica e Materiais (LIMA) do Instituto de Química (IQ), que é a AnB@C-Dots. Essa nova formulação é feita com nanopartículas de carbono do tipo Carbon Dots (C-Dots) juntamente com o princípio ativo anf B. A AnB@C-Dots é solúvel em água, pois a anf B é carregada pelos C-Dots. Os C-Dots possuem boa estabilidade química, são biocompatíveis e apresentam baixa toxicidade, em vista disso podem ser usados em várias aplicações biomédicas como carreadores de fármacos e bioimageamento (RODRIGUES *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Observou-se em ensaios *in vivo* com camundongos Balb/c e IRC tratados com C-Dots que não houve toxicidade renal conforme os resultados das análises bioquímicas e histopatológicas. Da mesma forma, ensaios *in vitro* com diversas linhagens celulares, como células humanas de câncer de endométrio (HeLa), células humanas de carcinoma hepático (HepG2), células hepáticas embrionárias (HL-7702), células de câncer de mama (MCF-7) e endotélios de vasos umbilicais (HUVEC), foram tratadas com as C-Dots observando-se baixa toxicidade (RODRIGUES *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Portanto, necessita-se urgentemente de novos tratamentos para essas doenças negligenciadas, que sejam eficientes, de menor toxicidade e acessíveis à população. A recomendação da ONU sobre o uso da AmBisome® mostra-se pouco aplicável devido o elevado custo do medicamento, o que o torna inviável para muitos países pobres, apesar de ser menos nefrotóxica comparada à Fungizone® e as outras formulações (BERN, ADLER-MOORE, BERENGUER *et al.*, 2006; AHMED, BROCCINI, CROFT, 2012; DNDi, 2017; PAHO, 2017; WHO, 2015). Por isso é importante o investimento em pesquisas quer seja promovendo novos medicamentos ou o desenvolvimento de novas formulações de princípios ativos já conhecidos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar por meio de análises histológicas a nefrotoxicidade de camundongos Balb/c tratados com a nova formulação de Anfotericina B, a AnB@C-Dots, comparando com formulações de convencionais de desoxicolato de sódio e de lipossomas.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar os cortes histológicos dos rins de camundongos Balb/c tratados e não tratados com as formulações de Fungizone<sup>®</sup>, AmBisome<sup>®</sup> e AnB@C-Dots;
- Procurar possíveis danos histológicos, característicos do princípio ativo em estudo, nos rins de camundongos.

### 3. METODOLOGIA

Os rins e as amostras de sangue de camundongos Balb/c foram obtidos no experimento descrito a seguir, o qual foi liderado por MSc. Carime Vitória da Silva Rodrigues, como parte de seu projeto de doutorado intitulado “Desenvolvimento de Nanoformulação de Anfotericina B para o Tratamento de Leishmaniose”. Esse trabalho foi desenvolvido sob orientação do prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues e co-orientação da profa. Dra. Raimunda Nonata Sampaio. Todos os resultados desse trabalho são objeto de patente em fase final de depósito.

#### 3.1. TIPO DE ESTUDO

Estudo *in vivo* do tipo experimental ou pré-clínico em camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem Balb/c.

#### 3.2. ANIMAIS

Para esse estudo foram usados trinta e seis camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, os quais foram divididos em seis grupos de estudo. Os animais, de 4 semanas aproximadamente, foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratórios, da Universidade Estadual de Campinas, mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da UnB, o qual apresenta infraestrutura e médico veterinário responsável. O ambiente do biotério possui luminosidade controlada, com ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. As gaiolas foram forradas com maravalha. A água era oferecida *ad libitum* e ração à vontade durante todo o experimento.

Os camundongos dos grupos 1 a 5 foram infectados com aproximadamente  $10^7$  formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Os camundongos do controle negativo, grupo 6, passaram pelo mesmo estresse da inoculação, entretanto neles foi administrado soro fisiológico a 0,9%. No dia da inoculação, os animais tinham 12 semanas de idade e peso médio de  $26,8 \pm 3,1$  (g).

Os grupos foram divididos em 6 grupos: grupo 1 - camundongos infectados e tratados com a AnB@C-Dots; grupo 2 - camundongos infectados tratados com Fungizone®; grupo 3 - camundongos infectados tratados com AmBisome®; grupo 4 - camundongos infectados e tratados com C-Dots; grupo 5 - controle positivo, camundongos infectados e não tratados, o placebo foi soro fisiológico a 0,9%; grupo 6 - controle negativo, camundongos não infectados e não tratados, o placebo foi soro fisiológico a 0,9%. A divisão dos grupos e a farmacoterapia pode ser vista de forma resumida na Tabela 1, assim como a farmacoterapia utilizada.

### 3.3. FARMACOTERAPIA

Os camundongos passaram pela confirmação da infecção e no mesmo dia iniciou-se a farmacoterapia, a qual durou 10 dias, tendo como dose de  $1\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de cada formulação e de C-Dots, e a dosagem cumulativa de todos foi de  $10\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  como pode ser visto na Tabela 1. A medicação foi administrada por via intraperitoneal, os grupos controles negativo, 5 e 6, receberam soro fisiológico em vez de medicamento.

Tabela 1: Farmacoterapia com as formulações de AnB@C-Dots, Fungizone® e AmBisome®.

Grupo	Infectado	Tratamento	Dosagem	Dosagem cumulativa
1	Sim	AnB@C-Dots	$1\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$	$10\text{mg.kg}^{-1}$
2	Sim	Fungizone®	$1\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$	$10\text{mg.kg}^{-1}$
3	Sim	AmBisome®	$1\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$	$10\text{mg.kg}^{-1}$
4	Sim	C-Dots	$1\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$	$10\text{mg.kg}^{-1}$
5	Sim	Soro fisiológico a 0,9% (controle positivo)	–	–
6	Não	Soro fisiológico a 0,9% (controle negativo)	–	–

Fonte: Compilação do autor.

No dia da eutanásia, após o fim da farmacoterapia, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilasina na dose de  $10\text{mg/Kg}$  e mais quetamina na dose de  $90\text{mg/Kg}$ , por via intramuscular, e em seguida foi realizada a coleta de uma amostra de sangue por punção intracardíaca, a qual foi usada para exames bioquímicos. Ainda sob o efeito dos anestésicos, os animais foram levados, individualmente, à câmara de saturação de  $\text{CO}_2$ , sendo esta fechada de maneira a atingir saturação superior a 70%. Os camundongos foram a óbito por parada cardiorrespiratória, conforme recomendado pela comissão de ética no uso animal. Os órgãos rins, fígado, baço e pulmão foram extraídos para estudos de histopatologia, contudo neste trabalho foram analisados apenas os rins.

O ensaio *in vivo* foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da UnB, protocolo nº 8480/2016, e o certificado de aprovação encontra-se em anexo (Figura A1).

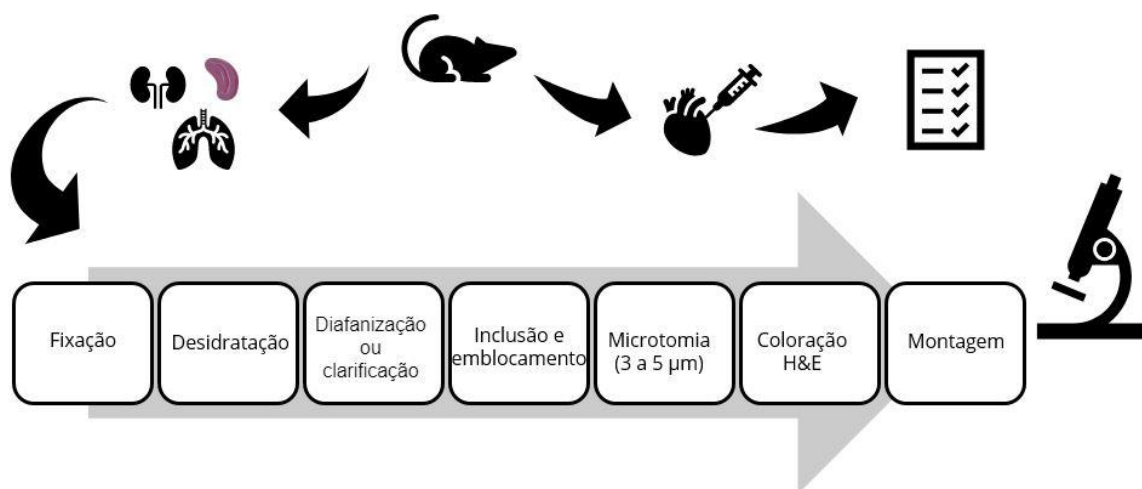
### 3.4. HISTOLOGIA

Nesse experimento os rins foram preparados para análise histopatológica. Após terem sido coletados de forma mais asséptica possível, foram lavados com soro fisiológico

a 0,9% para retirada do excesso de sangue e rapidamente fixados em paraformaldeído (Sigma-Aldrich, BRA) a 4% em PBS por três horas a temperatura ambiente. Depois passaram pelo processo de desidratação em etanol a diferentes concentrações (70 a 100%), diafanização ou clarificação, em solução 1:1 de álcool absoluto e xilol, e também em xilol puro, por 1h em cada solução. As amostras foram então incluídas e emblocadas, individualmente, em parafina (Dinâmica Química Contemporânea LTDA., BRA). Para obtenção dos cortes com 3 a 5µm de espessura foi utilizado um micrótomo Leica modelo RM2125RT (Leica, Alemanha). Neste trabalho fez-se cortes semi-seriados, desprezando os dez cortes seguintes após a obtenção de uma lâmina com três cortes.

Uma vez obtidos os cortes histológicos, procedeu-se para a coloração pelo método de hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas selecionadas foram submetidas a processo de desparafinização e hidratação no método de coloração, onde pode ser visto na Tabela 1, em que foi usado, além dos corantes H&E, soluções de xilol (Dinâmica Química Contemporânea LTDA., Brasil), álcool (Dinâmica Química Contemporânea LTDA., Brasil) de 100%, 90% e 70% e água. Após o último banho de xilol, cobriram-se as lâminas com lamínulas utilizando-se verniz incolor (Acrilex®, BRA) e foram colocadas para secar à temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas e fotografadas digitalmente com microscópio eletrônico de luz EVOS® FL Auto Imaging System e usando o software EVOS® FL Auto (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os procedimentos histológicos adotados são descritos resumidamente no Figura 6.

Figura 6: Esquema do método da histologia.



Fonte: Compilação do autor.

Tabela 2: Método de coloração H&E.

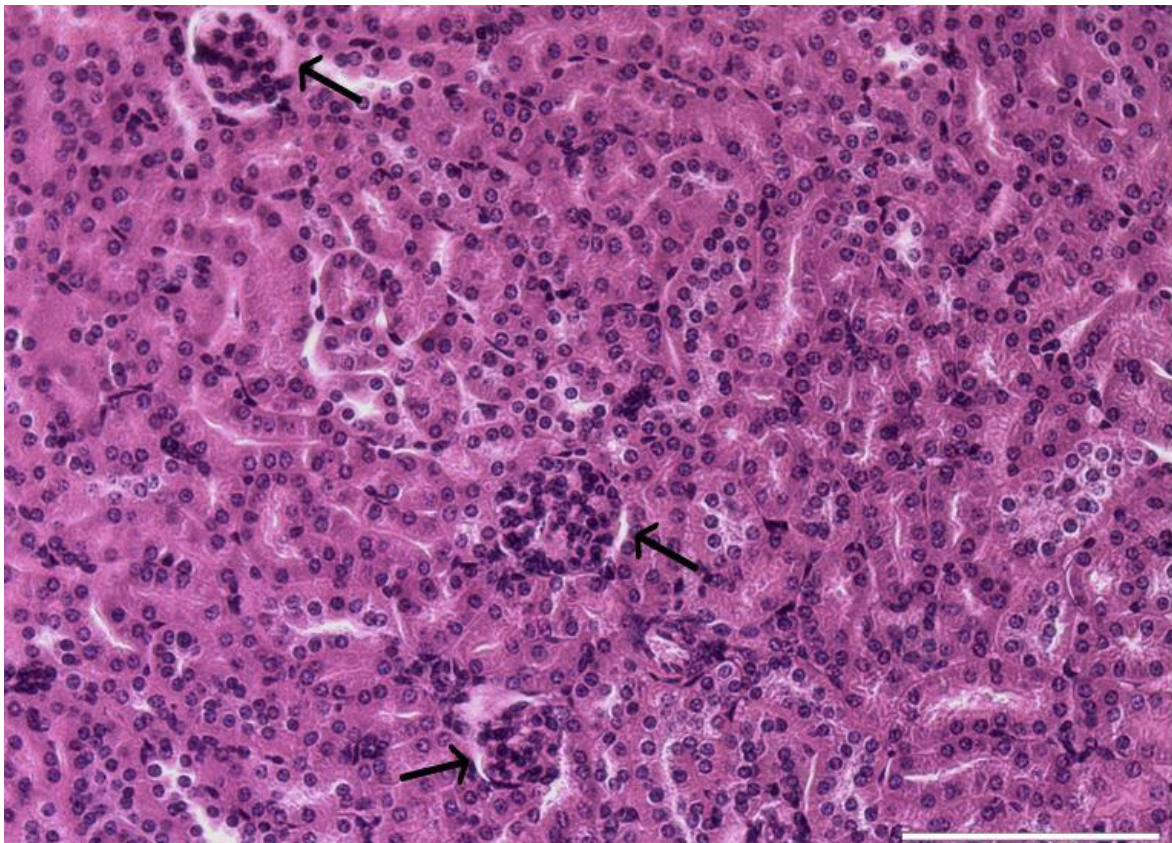
	Solvente/Reagente	Tempo
1.	Xilol 1	1 minuto
2.	Xilol 2	1 minuto
3.	Xilol 3	1 minuto
4.	Xilol:Água (1:1)	1 minuto
5.	Álcool 100%	1 minuto
6.	Álcool 90%	1 minuto
7.	Álcool 80%	1 minuto
8.	Álcool 70%	1 minuto
9.	Água destilada	1 minuto
10.	Hematoxilina	3 minutos
11.	Água destilada	1 minuto
12.	Eosina	2 minutos
13.	Água destilada	1 minuto
14.	Álcool 70%	1 minuto
15.	Álcool 80%	1 minuto
16.	Álcool 90%	1 minuto
17.	Álcool 100%	1 minuto
18.	Xilol 1	1 minuto
19.	Xilol 2	1 minuto
20.	Xilol 3	1 minuto

Fonte: Compilação do autor.

#### 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A toxicidade renal é avaliada por análise histopatológica, considerada o padrão ouro, e por outros meios de análises que contribuam para concluir o diagnóstico, como análise de analitos séricos que indicam o funcionamento renal. Neste trabalho foram realizadas análises histopatológicas de rins de camundongos dos grupos 1 a 6, como visto nas Figuras de 7 a 12.

Figura 7: Córtex renal de um representante do grupo 1, tratado com AnB@C-Dots. Aumento de 60x e as setas indicam glomérulos.

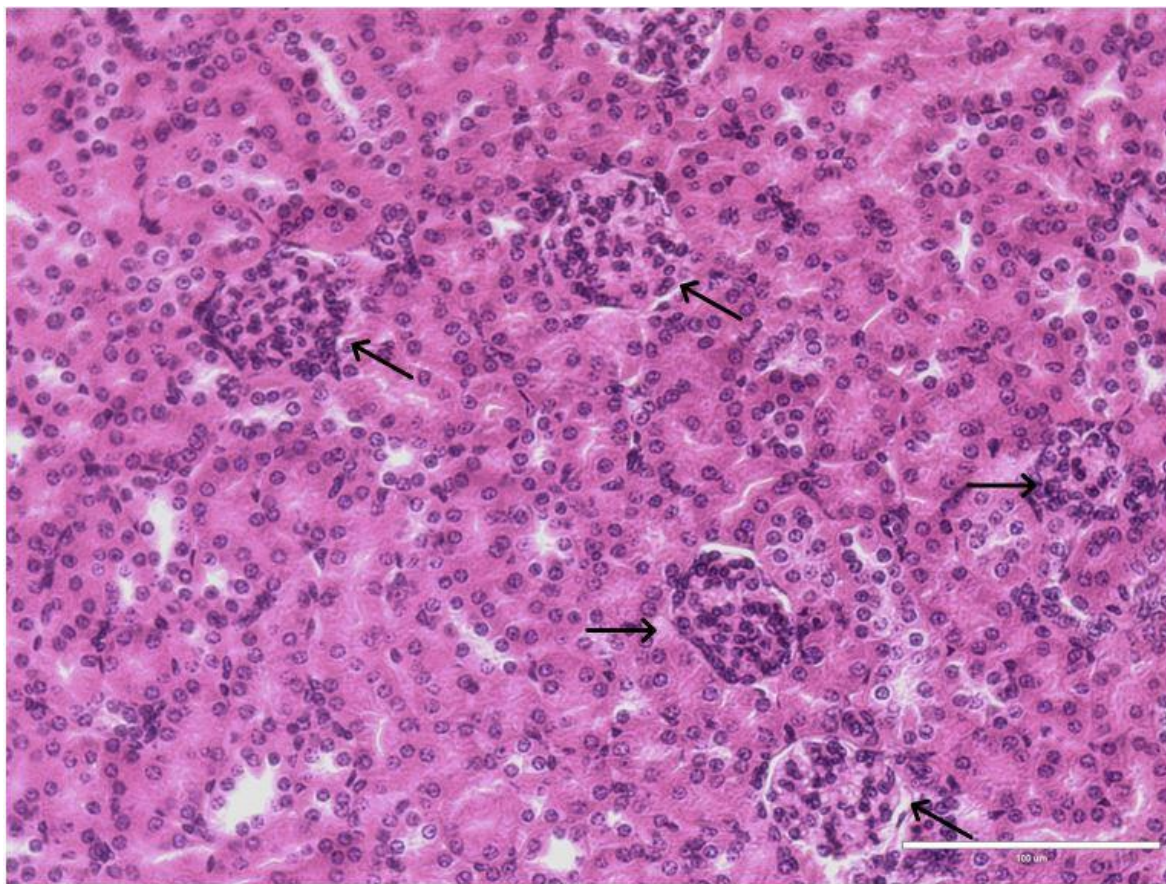


Fonte: Compilação do autor.

A Figura 7 exibe a fotografia da região mais externa do rim denominada de córtex renal, obtida com aumento de 60x, na qual observa-se glomérulos normais apontados pelas setas. Essa imagem foi obtida do grupo 1, o qual foi tratado com AnB@C-Dots tendo como dosagem cumulativa de  $10 \text{ mg. kg}^{-1}$ . Os cortes histológicos analisados desse grupo não apresentaram alterações morfológicas.



Figura 8: Córtex renal de um representante do grupo 2, tratado com Fungizone®. Aumento de 60x e as setas indicam glomérulos.



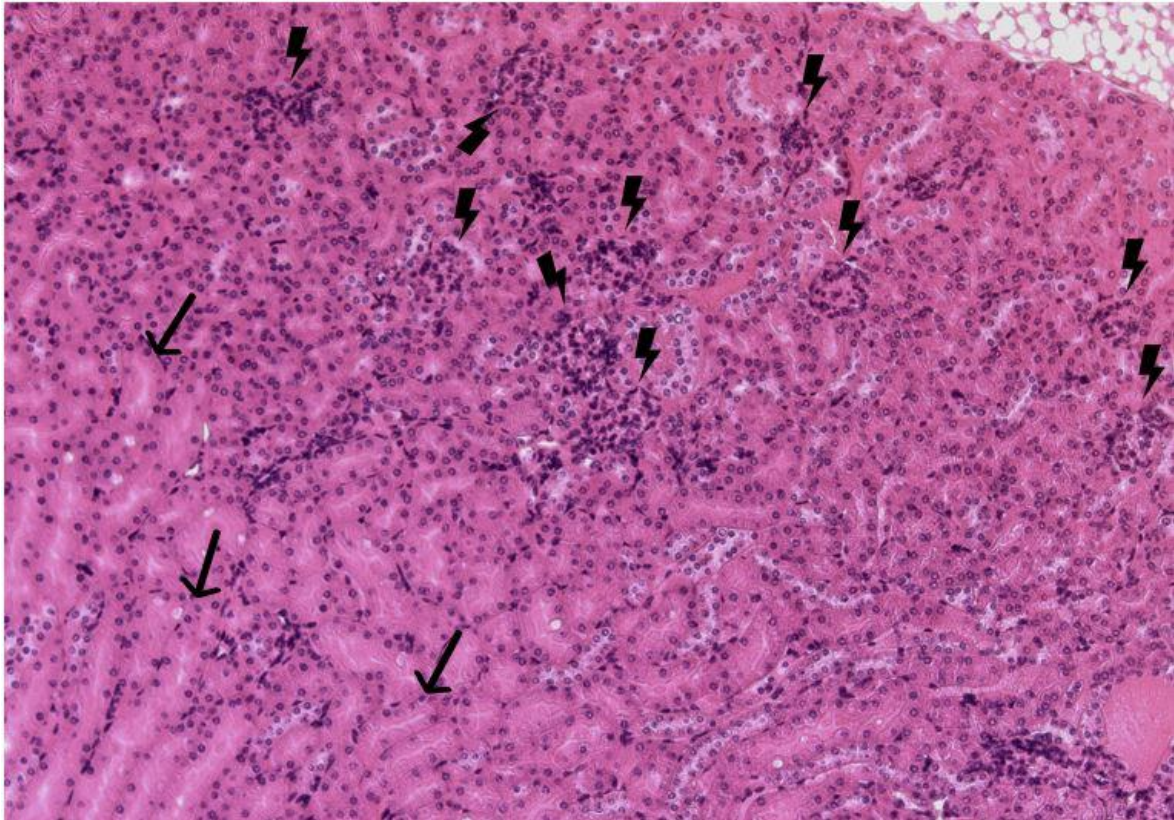
Fonte: Compilação do autor.

O grupo 2 tratado pela formulação de anf B desoxicolato, da marca Fungizone® com dosagem cumulativa de  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , é representado pela Figura 8. Na imagem, com aumento de 60x, visualiza-se os glomérulos renais indicados por as setas. Ao redor dos glomérulos não havia presença de espaço em branco significativo que indicasse isquemia, assim as análises histopatológicas concluíram que não houve toxicidade renal. Para fechar o diagnóstico é preciso que as análises séricas de creatinina e ureia sejam analisadas para corroborar com os dados obtidos nesse estudo.

O rim de mamíferos é dividido em região cortical e medular, mais externa e interna respectivamente. Nas análises morfológicas o enfoque principal foi o córtex renal, onde dispõe-se a maior quantidade de néfrons, que são as unidades funcionais que realizam a filtração do sangue, área essa mais afetada por substâncias nefrotóxicas. O néfron é composto pelo glomérulo, TCP, TCD e pela mácula densa – localizada no início do TCD próximo ao glomérulo. A medula renal é subdividida em região mais interna e mais externa, nessa região (a mais externa) apresenta parte dos TCP e TCD, os quais começam no córtex. Nas imagens obtidas dos cortes histológicos visualizou-se os glomérulos e os TCP e TCD

normais, sem alterações morfológicas. Os túbulos de maior lúmen (região interna do túbulo, região mais clara) são os TCD que são os primeiros e os mais afetados pela anf B (KDIGO, 2012; LEVEY, BECKER, INKER, 2015; RIELLA, 2018).

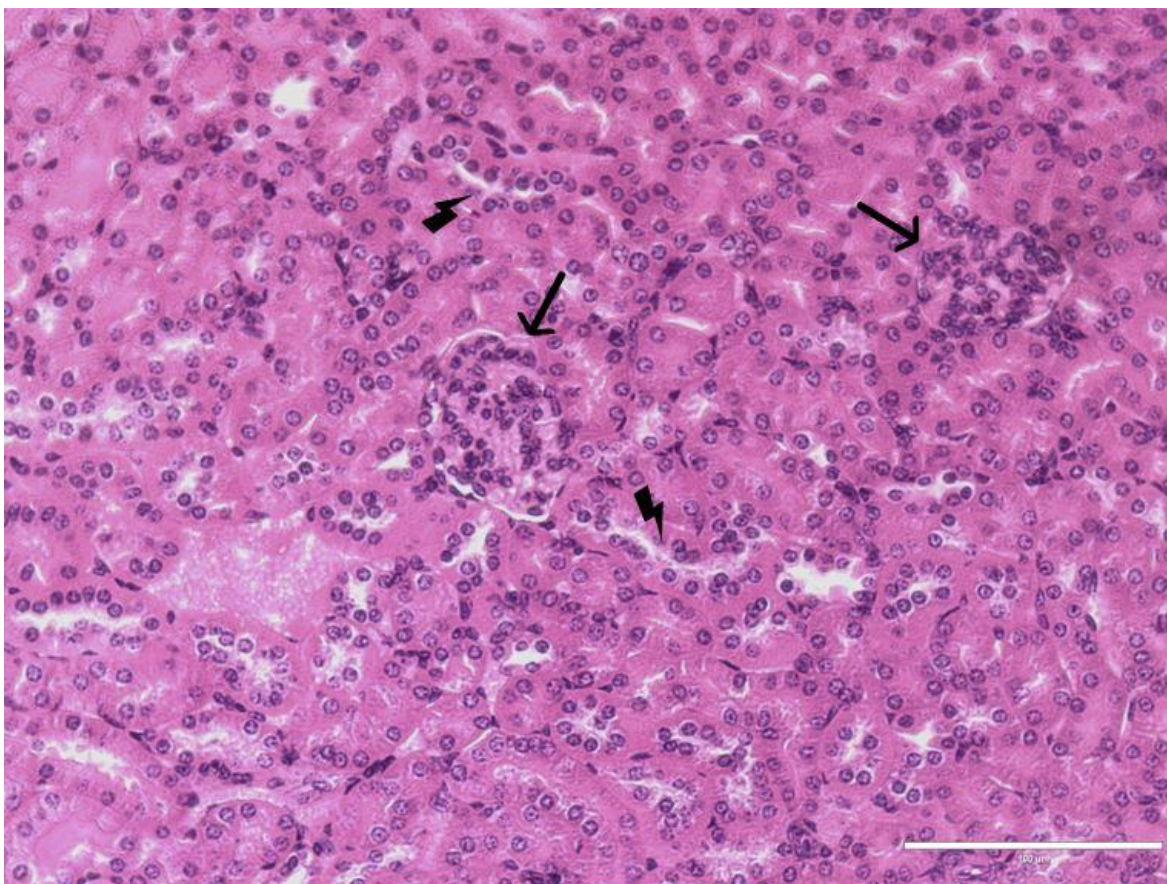
Figura 9: Córtex renal e parte da medula renal de um representante do grupo 3 tratado com AmBisome®. Aumento de 40x, os sinais de raio indicam glomérulos e as setas os túbulos coletores.



Fonte: Compilação do autor.

A imagem do grupo 3 (Figura 9) que foi tratado com a AmBisome® com dosagem cumulativa de  $10 \text{ mg. kg}^{-1}$ , com aumento de 40x, exibindo áreas da região medular e cortical do rim. Na imagem identificam-se os glomérulos saudáveis sinalizados pelos sinais de raios e rodeados de TCD. Na região medular, identifica-se os túbulos coletores indicados pelas setas. Os cortes histológicos de rim analisados não indicaram nenhuma patologia, contudo exames bioquímicos são necessários para confirmar alguma patologia como LRA.

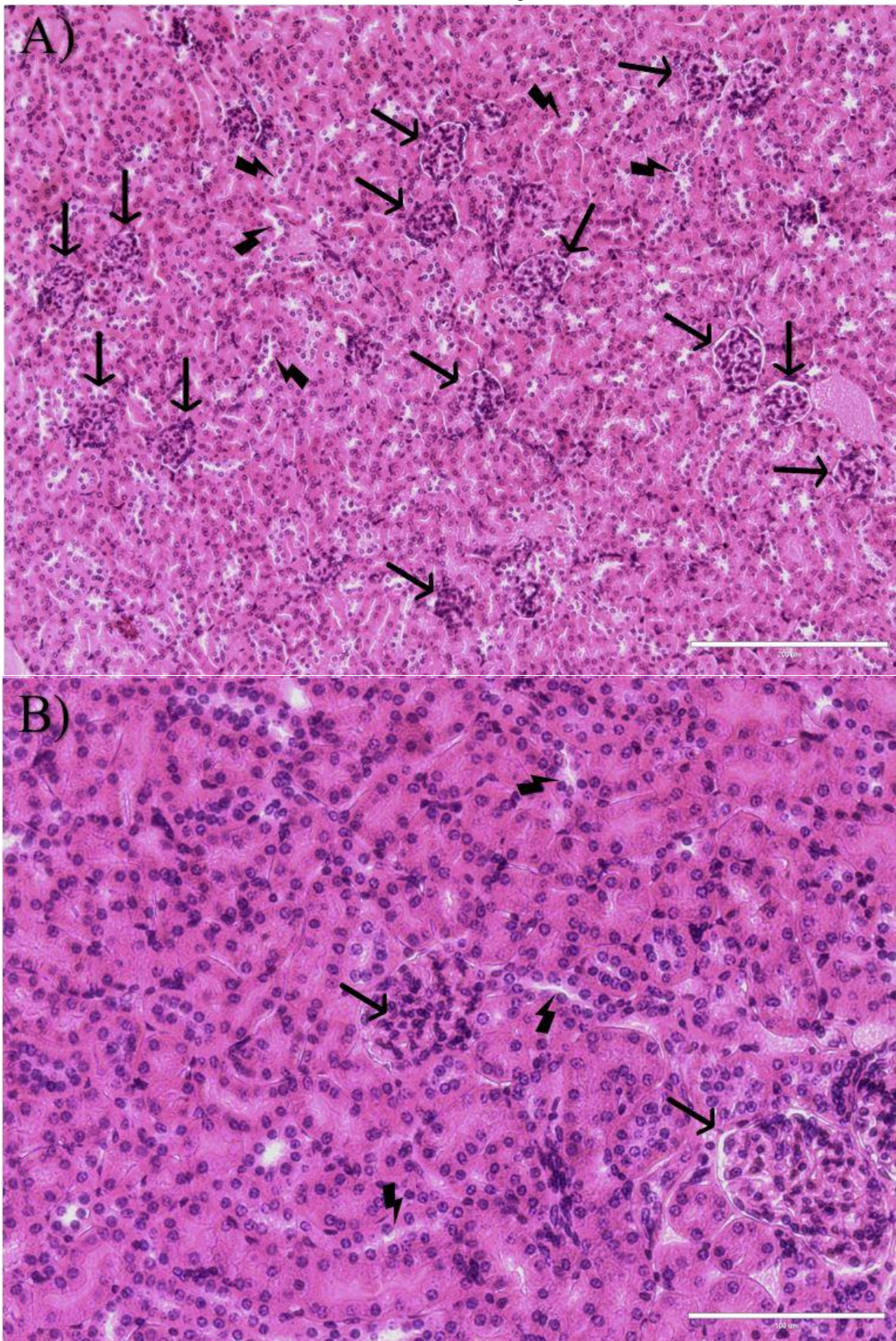
Figura 10: Córtex renal de um representante do grupo 4. Aumento de 60x, as setas indicam os glomérulos e os sinais de raios indicam os TCD.



Fonte: Compilação do autor.

A Figura 10 representa o corte histológico de um representante do grupo 4, tratados com C-Dots com dosagem cumulativa de  $10 \text{ mg. kg}^{-1}$ . Na imagem são identificados os glomérulos pelas setas e os sinais de raios indicam os TCD. As análises histológicas desse grupo não apresentaram danos histológicos renais, como esperava-se, pois, os C-Dots apresentam baixa toxicidade (RODRIGUES *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Figura 11: Córtex renal de um representante do grupo 5 (A), controle positivo, e do grupo 6, controle negativo (B). Aumento de 40x (A) e aumento de 60x (B), setas indicam glomérulos e sinais de raios indicam TCD.



Fonte: Compilação do autor

Na Figura 11 encontram-se imagens de tecido renal de um representante de cada grupo controle, grupo 5 (controle negativo) e grupo 6 (controle positivo), de aumento de 40x e aumento de 60x respectivamente. Nas imagens percebe-se glomérulos saudáveis indicados por setas e TCD sem danos, indicados por sinais de raios.

Neste trabalho buscava-se danos histológicos que progridam de Necrose Tubular Aguda (NTA) ao desenvolvimento de LRA ou em caso mais grave a IRA. Para isso, uma série de fatores antecede e podem surgir com o uso de uma substância nefrotóxica, como o caso em estudo desse trabalho com formulações de anf B (KDIGO, 2019; LEVEY, BECKER, INKER, 2015; PATZER, 2008). Essa molécula causa inicialmente danos em células epiteliais presentes nos túbulos renais, podendo evoluir para a NTA, a qual pode ser detectada em análise histopatológica (FANOS, CATALDI, 2000; FOLK *et al.*, 2017; LÓPEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018; PATZER, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2014). Essas alterações morfológicas acontecem na região cortical e na parte mais externa da região medular do rim e foi a mais pesquisada nesse trabalho.

A anf B é usada há mais de 50 anos, sendo bem conhecidos seus efeitos adversos como a nefrotoxicidade, já tendo sido considerada como padrão ouro para muitas IFI além de ser eficaz em outras doenças como a leishmaniose (FANOS, CATALDI, 2000; FOLK *et al.*, 2017; KDIGO, 2012; PATZER, 2008). Sabendo-se da eficácia dessa molécula e de muitos dados sobre os seus efeitos adversos, muitos pesquisadores buscam fazer formulações da anf B que sejam menos tóxicas, como AnB@C-Dots que foi desenvolvida por pesquisadores do LIMA. Por enquanto, a AmBisome<sup>®</sup>, que já está no mercado há mais de 30 anos ainda lidera o uso terapêutico, apesar do alto custo e de sua dosagem ser maior que das formulações de anf B desoxicolato (AVERSA *et al.*, 2017).

A diferença do custo para uma mesma quantidade da AmBisome<sup>®</sup> das outras formulações de desoxicolato é bastante pronunciada, como visto na lista da CMED presente no site da ANVISA. O preço da Anforicin B<sup>®</sup> da Cristália de R\$ 20,74 (vinte reais e setenta e quatro centavos) representa aproximadamente 0,135% do preço da AmBisome<sup>®</sup> que é de R\$ 15.330,66 (quinze mil e trezentos e trinta reais e sessenta e seis centavos). Apesar que, deve-se ressaltar que as posologias de ambas são diferentes, a quantidade usada para o mesmo tipo de doença não é igual e a quantidade usada da formulação lipossomal de referência é maior (ARONSON, HERWALDT, LIBMAN, 2016; CHAVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2015; DNDi, 2017; FOLK *et al.*, 2017). Logo, como questão de saúde pública, urge

que novas formulações eficazes e menos tóxicas sejam desenvolvidas. Assim a AnB@C-Dots foi desenvolvida com objetivo de ser uma formulação menos tóxica do que a Fungizone® e mais acessível que a AmBisome® (RODRIGUES *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

A nefrotoxicidade é um efeito adverso muito comum e um dos primeiros a ser notado durante o tratamento com formulações de anf B. A análise histopatológica é o padrão ouro para se confirmar a nefrotoxicidade, contudo nem sempre é o mais viável. Assim, uma outra forma de se avaliar a função renal é pelas dosagens séricas de ureia e creatinina (AHMED, BROCCINI, CROFT, 2012; FANOS, CATALDI, 2000; MAYER *et al.*, 2002; LÓPEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2014). Por meio desta última possibilita-se estimar o volume da filtração glomerular e assim pode-se avaliar se a função renal está sendo afetada, e conforme os resultados obtidos poderá indicar alterações na farmacoterapia. Dessa forma, ajustar-se-á a dose do medicamento ou suspender-se-á, para assim evitar o desenvolvimento de LRA ou que desenvolva algo mais sério como a Injúria Renal Aguda (IRA) (BRITO, OLIVEIRA, SILVA, 2016; KDIGO, 2012; LEVEY, BECKER, INKER, 2015; PATZER, 2008).

Além da nefrotoxicidade, também outros órgãos são afetados pela anf B, pois, a molécula de colesterol encontra-se na membrana de várias células de mamíferos, sendo assim, outros órgãos como fígado e coração são afetados (AHMED, BROCCINI, CROFT, 2012; AZANZA, SÁDABA, REIS, 2015; FANOS, CATALDI, 2000; ROCHELLE *et al.*, 2018).

## 5. CONCLUSÃO

O trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de análises histológicas, a toxicidade renal decorrente do uso da anf B, que já é conhecida e bastante relatada na literatura especializada desde a sua descoberta. As análises histopatológicas realizadas não indicaram nefrotoxicidade nos animais tratados com AnB@C-Dots, Fungizone<sup>®</sup> e AmBisome<sup>®</sup>. Como as formulações menos nefrotóxicas são de alto custo, demanda-se que haja o desenvolvimento de formulações mais acessíveis, principalmente porque a população que mais necessita dessa medicação é a mais carente e suas doenças são negligenciadas.

Os resultados aqui apresentados não concluem a pesquisa. Portanto, mais órgãos devem ser analisados para avaliar a toxicidade, e o resultados dos exames bioquímicos serão analisados e avaliados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA). Iniciou-se a análise dos rins por serem os primeiros a serem afetados, o que não exclui outros órgãos que também sofrem com a toxicidade da anf B.

## 6. REFERÊNCIAS

ADLER-MOORE, JILL P; GANGNEUX, JEAN-PIERRE; PAPPAS, PETER G. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. **Medical Mycology**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2016.

AHMED, ABEER H A MOHAMED; BROCCINI, STEPHEN; CROFT, SIMON L. Recent advances in development of amphotericin B formulations for the treatment of visceral leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, p. 695–702, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Câmara De Regulação Do Mercado De Medicamentos (CMED). 2019. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/listas-de-precos> >. Acesso em 14 de nov. de 2019.

AZANZA, JOSÉ RAMÓN; SÁDABA, BELÉN; REIS, JOANA. Liposomal formulations of amphotericin B: differences according to the scientific evidence. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 28, n. 6, p., 275–281, 2015.

ARONSON, NAOMI; HERWALDT, BARBARA L.; LIBMAN, MICHAEL *et al.* Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases IDSA**, v. 63, n. 12, p. 202–264, 2016.

AVERSA, FRANCO; BUSCA, ALESSANDRO; CANDONI, ANNA *et al.* Liposomal amphotericin B (AmBisome®) at beginning of its third decade of clinical use Franco. **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 131–143, 2017.

BERN, CARYN; ADLER-MOORE, JILL; BERENGUER, JUAN *et al.* Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 917-924, 2006.

BURZA, SAKIB, CROFT, SIMON L., BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CHAVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL; RIBEIRO, TATIANA GOMES; CASTILHO, RACHEL OLIVEIRA *et al.* Review Article New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235–242, 2015.



CZUB, JACEK; BAGINSKI, MACIEJ. Modulation of amphotericin B membrane interaction by cholesterol and ergosterol - A molecular dynamics study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 33, p. 16743–16753, 2006.

DRUGBANK.CA. Amphotericin B – Drugbank, 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00681>>. Acesso em: 01 de nov. de 2019.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDi). Relatório Anual Global DNDi 2017. 2017. Disponível em:< <https://www.dndial.org/comunicacao/relatorio-anual/>>. Acesso em 02 de nov. de 2019.

FANOS, V.; CATALDI, L. Amphotericin B-Induced Nephrotoxicity: A Review. **Journal of Chemotherapy**, v. 12, n. 6, p. 463–470, 2000.

FOLK, ALEXANDRA; BALTA, CORNEL; HERMAN, HILDEGARD *et al.* Flucytosine and Amphotericin B Coadministration Induces Dose-Related Renal Injury. **Dose-Response**, v. 15, n. 2, p. 1–9, 2017.

HONG, WEI; LIU, YAN; LI, MING-HUI *et al.* In vivo toxicology of carbon dots by 1H NMR-based metabolomics. **Toxicology Research**, v. 7, n. 834, p. 834–847, 2018.

KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) ACUTE KIDNEY INJURY WORK GROUP. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. **Kidney International Supplements**, v. 2, p. 1–138, 2012.

LANZA, JULIANE S.; POMEL, SÉBASTIEN; LOISEAU, PHILIPPE M. *et al.* Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 10, p. 1063–1079, 2019.

LEVEY, ANDREW S.; BECKER, CASSANDRA; INKER, LESLEY A. Glomerular Filtration Rate and Albuminuria for Detection and Staging of Acute and Chronic Kidney Disease in Adults: A Systematic Review. **Journal of the American Medical Association**, v. 313, n. 8, p. 837–846, 2015.

LÓPEZ-SÁNCHEZ, ALICIA; PÉREZ-CANTERO, ALBA; TORRADO-SALMERÓN, CARLOS *et al.* Efficacy, Biodistribution, and Nephrotoxicity of Experimental Amphotericin B-Desoxycholate Formulations for Pulmonary Aspergillosis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 62, n. 7, p. 1–11, 2018.

MAYER, J., DOUBEK, M., DOUBEK, J. *et al.* Reduced Nephrotoxicity of Conventional Amphotericin B Therapy after Minimal Nephroprotective Measures:

Animal Experiments and Clinical Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 379–388, 2002.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PUBCHEM DATABASE. Deoxycholic acid, CID=222528. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Deoxycholic-acid>. Acesso em 15 de nov. 2019.

NEUMANN, ANNA, WIECZOR, MILOSZ, ZIELINSKA, JOANNA. *et al.* Membrane Sterols Modulate the Binding Mode of Amphotericin B without Affecting Its Affinity for a Lipid Bilayer. **Langmuir**, v. 32, n. 14, p. 3452–3461, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Epidemiological Report of the Americas. Leishmaniasis (March, 2019). Washington, n. 7, 2019. Disponível em: < <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>>. Acesso em 3 de nov. de 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis, 2019. Disponível em: < [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=en)>. Acesso em 05 de nov. de 2019.

\_\_\_\_\_. Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas 2017-2022. Washington, 2017. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34147>>. Acesso em 31 de out. de 2019.

PALACIOS, DANIEL S.; DAILEY, IAN; SIEBERT, DAVID M. *et al.* Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 17, p. 6733-6738, 2011.

PATZER, LUDWIG. Nephrotoxicity as a cause of acute kidney injury in children. **Pediatric Nephrology**, v. 23, n. 12, p. 2159–2173, 2008.

RIELLA, MIGUEL C. Princípios de nefrologia e distúrbios hidreletrolíticos. 6.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

ROCHELLE, ANDREZA; SILVA, ANDRÉ LEANDRO; COJEAN, SANDRINE *et al.* In-vitro and in-vivo antileishmanial activity of inexpensive Amphotericin B formulations: Heated Amphotericin B and Amphotericin B-loaded microemulsion Andreza. **Experimental Parasitology**, v. 192, p. 85–92, 2018.

RIBEIRO, TATIANA G.; FRANCA, JUÇARA R; FUSCALDI, LEONARDO L. *et al.* An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 5341–5353, 2014.

RODRIGUES, CARIME V., CORREA, JOSÉ. R., AIUBE, CARLOS M., *et al.* Down- and up-conversion photoluminescence of carbon-dots from brewing industry waste: Application in live cell-imaging experiments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 12, p. 2623–2628, 2015.

SINGH, VIKRAM; RAWAT, KUNDAN S.; MISHRA, SHACHI *et al.* Biocompatible fluorescent carbon quantum dots prepared from beetroot extract for in vivo live imaging in *C. elegans* and BALB/c mice. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 20, p. 3366–3371, 2018.

SOUZA, ALINE; MARINS, DÉBORA SOARES SOUZA; MATHIAS, SAMIR LEITE *et al.* Promising nanotherapy in treating leishmaniasis Aline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1-2, 2018.

SUNDAR, SHYAM; CHAKRAVARTY, JAYA. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 159-166, 2010.

ZHENG, XIAO; SHAO, DAN; LI, JING *et al.* Single and repeated dose toxicity of citric acid-based carbon dots and a derivative in mice. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5 n. 111 p. 91398 -91406, 2015.

WANG, JUNQING; ZHANG, PENGFEI; HUANG, CHAO *et al.* High Performance Photoluminescent Carbon dots for *In Vitro* and *In Vivo* Bioimaging: Effect of Nitrogen Doping Ratios. **Langmuir**, p. 1–22, 2015.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/Department of control of neglected tropical diseases. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. **Word Health Organization**, Geneva, 2015. Disponível em: < [https://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564861/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/)> Acesso em 28 de out. de 2019.

## 7. ANEXOS

Figura A1: Declaração do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) aprovando o uso de camundongos no estudo deste trabalho.

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

Brasília, 07 de agosto de 2017.

**DECLARAÇÃO – PRORROGAÇÃO DE PRAZO**

Declaramos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA NANOFORMULAÇÃO COMPOSTA POR C-DOTS E ANFOTERICINA B (ANFoB@C-DOT) NO TRATAMENTO CONTRA LEISHMANIOSE**”, Protocolo n.º 8480/2016, sob responsabilidade do Professor Marcelo Oliveira Rodrigues foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Camundongo BALB/C(36). A presente aprovação é válida pelo período de: 15/04/2016 a 31/08/2019.

  
UnB

  
Prof. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB

  
CEUA

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