



**UAIG**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**Desenvolvimento de novos sistemas  
terapêuticos para o tratamento da tuberculose**

**Ivone Rosário Borges**

Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**Novembro de 2012**

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.



**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**Desenvolvimento de novos sistemas  
terapêuticos para o tratamento da tuberculose**

**Ivone Rosário Borges**

Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**Dissertação orientada por:**  
Professora Doutora Ana Margarida Grenha  
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve

**Novembro de 2012**

## **Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose**

### **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser a autora deste trabalho que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

### **Copyright Ivone Rosário Borges**

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado o crédito ao autor.

## **AGRADECIMENTOS**

O caminho até aqui nunca foi fácil, mas também nunca foi solitário! São várias as pessoas a quem quero agradecer por todo o apoio e compreensão.

Começo por agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Ana Margarida Grenha pela sua disponibilidade e rapidez no esclarecimento de todas as dúvidas, por todas as sugestões e críticas com o objetivo de enriquecer o meu trabalho.

À Professora Mestre Isabel Ramalinho, pela motivação e ensinamentos e pela sua missão bem-sucedida, como coordenadora de estágio.

À minha família por estarem sempre presentes, por partilharem as minhas alegrias e me ajudarem nos momentos de fraqueza. Um agradecimento especial aos meus pais e irmão, aqueles a quem tudo devo e a quem nunca vou conseguir retribuir o que me dão.

Ao Luís Gonçalves pela sua paciência infinita, carinho e amor.

À minha amiga Teresa Calejo por toda a ajuda e amizade.

Às minhas amigas, Liliana Pereira, Catarina Rodrigues, Flora Amorim e Inês Rosa pelo apoio, amizade e por partilharem comigo, durante quatro anos alguns dos melhores momentos da minha vida.

## RESUMO

A tuberculose é atualmente, a segunda causa de morte por doença infecciosa a nível mundial e estima-se que 1/3 da população está infetada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, o seu agente etiológico. A tuberculose pulmonar é a forma mais comum, sendo altamente contagiosa e potencialmente fatal se não for tratada. O problema é agravado em populações também infetadas pelo VIH, pelo aumento da suscetibilidade. Quando o sistema imunitário não consegue conter a propagação do *M. tuberculosis*, este pode-se disseminar para outros órgãos altamente irrigados, provocando tuberculose extrapulmonar ou disseminada.

Um dos maiores obstáculos à erradicação da doença é o surgimento de estirpes multi- (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) aos fármacos atuais, para o qual muito contribui o abandono do tratamento pelos doentes, motivado pela extensa duração da terapia e efeitos adversos difíceis de suportar. Assim, é de extrema urgência o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes. Contudo, apesar dos esforços nesse sentido, muitas moléculas já desenvolvidas terão de ultrapassar ainda muitos ensaios antes de chegarem ao mercado. Além disso, a existência de poucos modelos animais que mimetizem a doença nos humanos e o receio de não haver retorno do enorme investimento, porque a grande maioria dos casos ocorre em países com fracos recursos, tem dissuadido as companhias farmacêuticas.

Deste modo, a melhoria dos fármacos já existentes, principalmente os de primeira linha, com novas formulações e novas vias de administração, é vista como uma alternativa promissora para aumentar a eficácia do tratamento, reduzir a toxicidade associada e incrementar a adesão à terapêutica.

Neste trabalho, serão abordados alguns dos estudos já realizados *in vitro* e *in vivo*, com muitos dos mais recentes sistemas terapêuticos para a veiculação de fármacos antituberculosos, como os lipossomas, niossomas, micropartículas e nanopartículas poliméricas e as nanopartículas lipídicas sólidas, administrados pelas diferentes vias. Muitos deles comprovam a viabilidade deste tipo de abordagem.

**Palavras-chave:** Tuberculose, Estirpes multirresistentes, Estirpes extensivamente resistentes, Novos sistemas terapêuticos, Libertação prolongada, Vias de administração.

## ABSTRACT

Tuberculosis is currently the second leading cause of death from an infectious disease worldwide and it is estimated that 1/3 of the population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, the etiological agent. Pulmonary tuberculosis is the most common form, is highly contagious and potentially fatal if untreated. The problem is exacerbated in people also infected with HIV, by the increased susceptibility. When the immune system fails to contain the spread of *M. tuberculosis*, it can spread to other organs highly irrigated, causing disseminated or extrapulmonary tuberculosis.

One of the biggest obstacles to the eradication of the disease is the emergence of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) strains for which greatly contributes the abandonment of treatment by patients, motivated by the extensive duration of therapy and adverse effects difficult to handle. So it is extremely urgent to develop new and more effective drugs.

However, despite efforts to do so, many molecules already been developed, have to overcome many trials before reaching the market. Moreover, the existence of few animal models that can mimic the disease in humans and the fear there will be no return on investment, because the vast majority of cases occur in countries with limited resources, has deterred pharmaceutical companies.

Thus, improvement of existing drugs particularly the first line drugs with new formulations and new routes of administration, is seen as a promising alternative to increase the treatment efficacy, reduce associated toxicity and increase therapy compliance.

In this thesis, will be addressed some of the previous studies *in vitro* and *in vivo*, with many of the latest therapeutic systems to the antituberculosis drugs targeting, such as liposomes, niosomes, polymeric micro and nanoparticles and solid lipid nanoparticles, administered by different routes. Many of them prove the feasibility of this approach.

**Keywords:** Tuberculosis, Multi-drug resistant strains, Extensively-drug resistant strains, New therapeutic systems, Prolonged release, Routes of administration.

## ÍNDICE

Agradecimentos.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Índice.....	7
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabelas.....	11
Lista de Abreviaturas.....	12
1. Introdução.....	17
1.1 Epidemiologia.....	20
1.2 Etiologia e Transmissão.....	22
1.3 Patogénese.....	25
1.4 Diagnóstico.....	30
1.5 Manifestações Clínicas e Tratamento.....	33
2. Veiculação dos Fármacos em Novos Sistemas Terapêuticos.....	38
2.1 O interesse da veiculação local .....	41
2.1.1 Estrutura e Função do Sistema Respiratório.....	42
2.1.2 Administração Pulmonar.....	43
2.2 Métodos <i>in vitro</i> para a avaliação da eficácia dos sistemas terapêuticos.....	47
2.3 Métodos <i>in vivo</i> para a avaliação da eficácia dos sistemas terapêuticos.....	48
3. Novos Sistemas Terapêuticos com aplicação no tratamento da tuberculose.....	48
3.1 Lipossomas.....	48
3.1.1 Veiculação Passiva.....	53
3.1.1.1 Via Parenteral.....	53
3.1.1.2 Via Pulmonar.....	56
3.1.2 Veiculação Ativa.....	59
3.1.2.1 Via Parenteral.....	59
3.1.2.2 Via Pulmonar.....	60
3.2 Niossomas.....	61
3.2.1 Veiculação Passiva .....	63
3.2.1.1 Via Oral .....	63
3.2.1.2 Via Parenteral .....	63
3.2.1.3 Via não Especificada.....	64

3.3	Micropartículas Poliméricas.....	65
3.3.1	Veiculação Passiva.....	68
3.3.1.1	Via Oral.....	68
3.3.1.2	Via Parenteral.....	70
3.3.1.3	Via Pulmonar.....	72
3.4	Nanopartículas Poliméricas.....	76
3.4.1	Veiculação Passiva.....	78
3.4.1.1	Via Oral.....	78
3.4.1.2	Via Parenteral.....	82
3.4.1.3	Via Pulmonar.....	84
3.4.2	Veiculação Ativa.....	85
3.4.2.1	Via Oral.....	85
3.4.2.2	Via Parenteral.....	86
3.4.2.3	Via Pulmonar.....	86
3.5	Nanopartículas lipídicas sólidas.....	87
3.5.1	Veiculação Passiva.....	88
3.5.1.1	Via Oral.....	88
3.5.1.2	Via Pulmonar.....	89
3.5.2	Veiculação Ativa.....	89
3.5.2.1	Via Parenteral.....	89
4.	Conclusão.....	90
5.	Bibliografia.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> – Fases da infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
<b>Figura 1.2</b> – Taxas de incidência de tuberculose estimadas no ano de 2010.....	21
<b>Figura 1.3</b> – Prevalência estimada do VIH nos novos casos de TB no ano de 2010...	21
<b>Figura 1.4</b> - Taxa de incidência da tuberculose: evolução ao longo de 20 anos.....	22
<b>Figura 1.5</b> – Estrutura proposta para a parede celular do <i>M. tuberculosis</i> .....	24
<b>Figura 1.6</b> – Fagocitose de microrganismos.....	26
<b>Figura 1.7</b> – Localização e morfologia de um granuloma num pulmão doente.....	28
<b>Figura 1.8</b> – Patogénese da tuberculose.....	29
<b>Figura 1.9</b> – Radiografia ao tórax na posição pósterio-anterior.....	30
<b>Figura 1.10</b> – Mecanismos de ação dos antibióticos de primeira linha.....	34
<b>Figura 1.11</b> – Mecanismos de ação dos antibióticos de segunda linha.....	36
<b>Figura 2.1</b> – Representação parcial da zona condutora e da zona respiratória.....	42
<b>Figura 2.2</b> – Objetivos da seleção da via pulmonar para a administração de fármacos antituberculosos.....	44
<b>Figura 3.1</b> – Lipossomas com diferentes tamanhos e número de lamelas.....	49
<b>Figura 3.2</b> – Lipossomas como sistemas transportadores de fármacos para os macrófagos alveolares.....	51
<b>Figura 3.3</b> – Esquema de um lipossoma Stealth®.....	52
<b>Figura 3.4</b> – Histopatologia do pulmão de ratinhos infetados pelo <i>M. tuberculosis</i> tratados com rifabutina livre e encapsulada.....	54
<b>Figura 3.5</b> – Variação da atividade da gentamicina encapsulada em lipossomas com a concentração, administrada duas vezes por semana a ratinhos.....	55
<b>Figura 3.6</b> – Viabilidade das células alveolares A549 após incubação por 24 horas com várias concentrações de rifampicina livre ou incorporada em lipossomas.....	57
<b>Figura 3.7</b> – Comparação da concentração da ciprofloxacina nos macrófagos alveolares e a MIC <sub>90</sub> de vários parasitas intracelulares.....	58
<b>Figura 3.8</b> – Percentagem de citotoxicidade das diferentes concentrações de isoniazida e rifampicina encapsuladas e livres, nos macrófagos peritoneais.....	59
<b>Figura 3.9</b> – Unidades formadoras de colónias em diferentes órgãos de ratinho após quimioterapia com isoniazida e rifampicina nas formas livre e encapsulada.....	60
<b>Figura 3.10</b> – Estrutura do niossoma.....	62

<b>Figura 3.11</b> – Niossomas contendo isoniazida acoplados ao corante calceína, após a internalização pelos macrófagos.....	65
<b>Figura 3.12</b> – Microsfemas e microcápsulas poliméricas.....	66
<b>Figura 3.13</b> – Log CFU nos pulmões, fígado e baço após quimioterapia com isoniazida, rifampicina e pirazinamida livres e encapsuladas nas micropartículas de PLGA, em ratinhos infetados pelo <i>M. tuberculosis</i> .....	69
<b>Figura 3.14</b> – Concentrações plasmáticas médias da isoniazida encapsulada nas micropartículas poliméricas contendo rifampicina e isoniazida.....	71
<b>Figura 3.15</b> – Bactérias viáveis nos pulmões e no baço após doses única ou dupla de micropartículas de rifampicina encapsulada em micropartículas de PLGA.....	73
<b>Figura 3.16</b> – Observação microscópica de células NR8383 após a sua incubação com microsferas de 3 µm PLGA contendo rifampicina .....	74
<b>Figura 3.17</b> – Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas.....	76
<b>Figura 3.18</b> – Fotomicrografias representativas dos pulmões de cobaias infetadas com o <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , após 6 semanas de quimioterapia.....	80
<b>Figura 3.19</b> – Concentração plasmática da rifampicina livre e encapsulada nas nanopartículas de gelatina .....	82
<b>Figura 3.20</b> – Distribuição da rifampicina livre e encapsulada nas nanopartículas de gelatina pelos órgãos <i>in vivo</i> .....	83
<b>Figura 3.21</b> – Distribuição das nanopartículas de PBCA em relação ao <i>M. tuberculosis</i> intracelular.....	83
<b>Figura 3.22</b> – Incorporação celular da isoniazida transportada em nanopartículas de gelatina não manosiladas e manosiladas para os macrófagos alveolares .....	86
<b>Figura 3.23</b> – Estrutura de uma nanopartícula lipídica sólida.....	87

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> – Fármacos de primeira e segunda linha usados no tratamento da tuberculose.....	37
<b>Tabela 3.1</b> – Atividade <i>in vivo</i> das formas livre ou lipossomal da capreomicina em ratinhos, após um tratamento de cinco dias.....	56
<b>Tabela 3.2</b> – Características da rifampicina encapsulada nos niossomas.....	64

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AcINH** – Acetilisoniazida

**ADA** – Adenosina desaminase

**AMK** – Amicacina

**Arg** – Arginina

**AZT** – Azitromicina

**BAAR** – Bacilos álcool-ácido resistentes

**BAL** – Lavagem bronco alveolar

**BCG** – Bacilo de Calmette-Guérin

**BD** – Biodisponibilidade

**CFLX** – Ciprofloxacina

**CFP10** – *Culture filtrate protein 10-kDa*

**CFU** – Unidades formadora de colónias

**CLR** – Claritromicina

**CPM** – Capreomicina

**DCP** – Dicetilfosfato

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DOTS** – Estratégia de Tratamento Diretamente Observado

**DPIs** – Inaladores de pó seco

**DPPC** – Dipalmitoilfosfatidilcolina

**DPPG** – Dipalmitoilfosfatidilglicerol

**DSPC** – Diestearoilfosfatidilcolina

**DSPE** – Distearoilfosfatidiletanolamina

**ELISA** – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

**EMB** – Etambutol

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

**ESAT-6** – *Early secretory antigenic target 6-kDa*

**ETA** – Etionamida

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**GAT** – Gatifloxacina

**GEN** – Gentamicina

**GMM** – Glucose monomicolato

**GSD** – Desvio padrão geométrico

**h** – Horas

**HDL** – Lipoproteínas de alta densidade

**HLB** – Equilíbrio hidrofílico-lipofílico

**IFN- $\gamma$**  – Interferão-gama

**IgG** – Imunoglobulina G

**IGRA** – *Interferon gamma release assays*

**i.m.** – Intramuscular

**INH** – Isoniazida

**INHMS** – Metanossulfato de isoniazida

**iNOS** – Óxido nítrico sintase induzível

**i.p.** – Intraperitoneal

**i.v.** – Intravenosa

**KAN** – Canamicina

**kDa** – Quilodalton

**LAM** – Lipoarabinomanano

**LCR** – Líquido cefalorraquidiano

**LM** – Lipomanano

**Lis** – Lisina

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

**LUVs** – Vesículas unilamelares pequenas

**MAC** – Complexo *Mycobacterium avium*

**Man-C4-Col** – Colesten-5-iloxi-N-(4-((1-imino-2- $\alpha$ -tioglicosiletil)amino)butil)formamida

**MAs** – Macrófagos alveolares

**MBSA** – Albumina de soro bovino maleilada

**MDIs** – Inaladores pressurizados com válvula doseadora

**MDR** – Estirpe multirresistente aos fármacos

**MDR-TB** – Tuberculose multirresistente aos fármacos

**MFLX** – Moxifloxacina

**MIC** – Concentração mínima inibitória

**min** – Minuto

**mL** – Mililitro

**MLVs** – Vesículas multilamelares

**MM6** – Linha celular humana Mono Mac 6

**MMAD** – Diâmetro aerodinâmico determinado em função da massa média

**MPs** – Micropartículas

***M. tuberculosis*** – *Mycobacterium tuberculosis*

**NADPH** - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida

**nm** – Nanómetro

**NO** – Óxido nítrico

**NPs** – Nanopartículas

**OFLX** – Ofloxacina

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**O-SAP** – O-estearoil amilopectina

**PAS** – Ácido *para*-aminosalicílico

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

**PBCA** – Poli(*n*-butilcianoacrilato)

**PC** – Fosfatidilcolina

**PCL** – Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**PDLA** – Poli(ácido D-láctico)

**PDLLA** – Poli(ácido D,L-láctico)

**PEG** – Poli(etilenoglicol)

**PG** – Fosfatidilglicerol

**PGA** – Poli(ácido glicólico)

**PI** – Fosfatidilinositol

**PIM** – Fosfatidilinositolmanósidos

**PLA** – Poli(ácido láctico)

**PLGA** – Poli(ácido D,L-láctico-*co*-ácido glicólico)

**PLLA** – Poli(ácido L-láctico)

**PPD** – *Purified protein derivivate*

**Pro** – Prolina

**PS** – Fosfatidilserina

**PTH** – Protionamida

**PZA** – Pirazinamida

**RFB** – Rifabutina

**RIF** – Rifampicina

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RNI** – Intermediários reativos de azoto

**ROI** – Intermediários reativos de oxigénio

**s.c.** – Subcutânea

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

**SFM** – Sistema fagocitário mononuclear

**SIDA** – Síndrome da imunodeficiência adquirida

**SL** – Sulfatídeo

**SLNs** – Nanopartículas lipídicas sólidas

**SM** – Esfingomiéline

**SP** – Proteínas do surfactante

**STR** – Estreptomicina

**SUVs** – Vesículas unilamelares pequenas

$t_{1/2}$  – Tempo de semi-vida

**TAAN** – Testes de amplificação dos ácidos nucleicos

**TB** – Tuberculose

**Tc** – Temperatura de transição de fase

**TDM** – Trehalose dimicolato ou fator corda

**Thr** – Treonina

**TLR** – Recetores *Toll like*

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**ULVs** – Vesículas unilamelares

**UV** – Ultravioleta

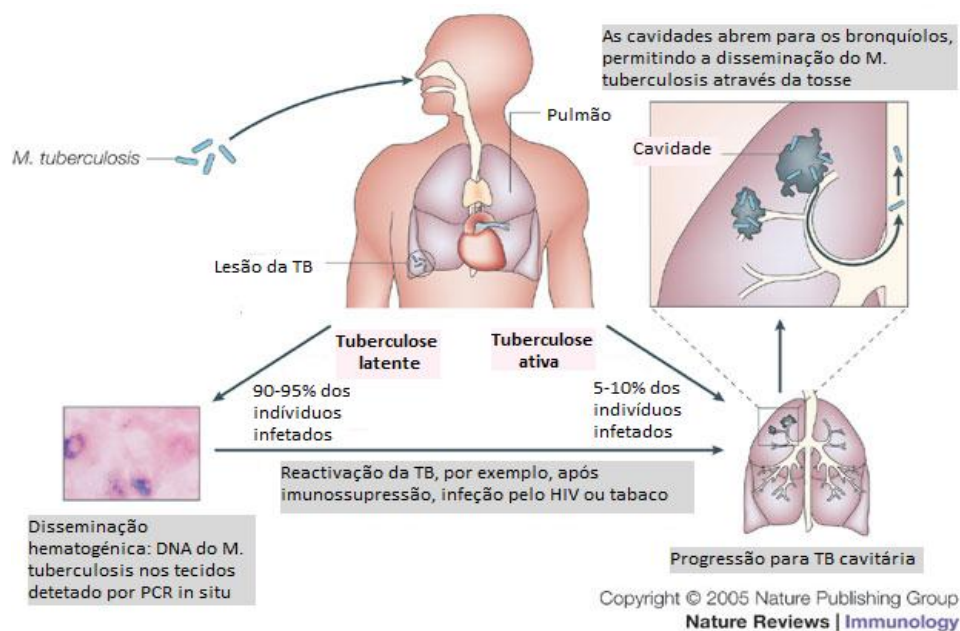
**VIH** – Vírus da imunodeficiência humana

**XDR** – Estirpe extensivamente resistente aos fármacos

$\mu\text{m}$  – Micrómetro

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa quase tão antiga quanto a humanidade, provocada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) que afeta sobretudo os pulmões (TB pulmonar), a mais importante porta de entrada dos bacilos e talvez a única (Flynn e Chan, 2001). É transmitida de pessoa para pessoa pela via respiratória, através de gotículas que contêm o bacilo, expelidas por indivíduos infetados com TB ativa, a forma da doença em que o *M. tuberculosis* se multiplica provocando a sintomatologia clínica e o paciente é altamente contagioso (Hari *et al.*, 2010). Após a inalação das gotículas, o bacilo aloja-se principalmente nos macrófagos alveolares (MAs) e estes podem proceder à destruição imediata do *M. tuberculosis*. No caso de o organismo do hospedeiro não conseguir conter a infeção, esta pode progredir para a TB ativa no espaço de 1-3 anos, o que acontece em cerca de 5-10% dos casos (Flynn e Chan, 2001). Contudo, a grande maioria das pessoas infetadas (90-95%), apresenta uma infeção não contagiosa, não sintomática, designada por TB latente em que o microrganismo permanece num estado de dormência e não se multiplica (Clark-Curtiss e Haydel, 2003). A TB latente pode, em algum momento da vida do paciente, progredir para a TB ativa, facto que acontece em cerca de 5-10% dos casos. Contudo no caso de co-infeção com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) o risco de desenvolver a doença ativa é de 5-15% em cada ano e de 50%, em alguma altura da vida (Fig.1.1) (Flynn e Chan, 2001).



**Figura 1.1** – Fases da infeção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (adaptado de Rook *et al.*, 2005).

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Para a profilaxia da doença, atualmente o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), uma estirpe viva atenuada do *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) é a única vacina disponível (Andersen e Doherty 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a sua administração por via intradérmica numa dose única, logo após o nascimento, em países com índices elevados da doença. Ela é altamente eficaz na prevenção da forma severa de TB na infância, a meningite tuberculosa e confere também alguma proteção contra a TB miliar (Colditz *et al.*, 1995; Trunz *et al.*, 2006). Contudo, a proteção contra a TB pulmonar no adulto é bastante variável (Colditz *et al.*, 1995) e não é duradoura (Sterne *et al.*, 1998). O desenvolvimento de uma vacina mais eficaz é visto como uma necessidade urgente (McShane *et al.*, 2004).

Apesar do tratamento atual ser altamente eficaz, a TB permanece como um dos principais problemas de saúde à escala global (Jordão e Vieira, 2011). Segundo a OMS, é já a segunda causa de óbito por doença infecciosa, logo a seguir ao VIH. Em 2010, registaram-se cerca de 1.4 milhões de mortes e quase 9 milhões de novos casos (WHO, 2011). A situação é particularmente complicada nos países subdesenvolvidos, devido aos sistemas de saúde deficitários que limitam o acesso aos cuidados médicos e ao tratamento, à instabilidade económica e política, qualidade de vida miserável com pessoas desnutridas e a viver em habitações sobrelotadas e com pouca higiene, pelo aparecimento de estirpes do *M. tuberculosis* multi- (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) aos fármacos antituberculosos e, principalmente pela elevada incidência do VIH/Síndrome da imunodeficiência adquirida (VIH/SIDA) (Chaisson e Martinson, 2008). A co-infecção TB/VIH apresenta uma interação sinérgica, pois cada uma acelera a progressão da outra (Mariani *et al.*, 2001). Nos doentes VIH positivos, a TB é a infeção oportunista mais comum e a principal causa de morte (Chakroborty, 2011). Além disso, o tratamento da TB em populações infetadas pelo VIH é complicado pela possibilidade de interações graves entre os fármacos antituberculosos e alguns antirretrovirais (Lienhardt *et al.*, 2010).

Nos países industrializados, apesar de não constituir um problema tão grave, tem vindo a mostrar-se como uma ameaça ressurgente, desde meados da década de oitenta. Para o aumento no número de casos, contribuíram o empobrecimento e envelhecimento da população mundial, a exclusão social (toxicodependentes, sem abrigo, alcoólicos), os movimentos migratórios a partir de países com TB endémica, o reduzido interesse da comunidade científica e governos em investir na luta contra a doença e o aparecimento de estirpes resistentes aos fármacos antituberculosos. O desenvolvimento destas estirpes

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

deriva, em grande parte, da elevada taxa de abandono do tratamento extenso e que apresenta muitos efeitos adversos. Mas, a principal causa para este aumento da TB nos países industrializados é a imunossupressão como consequência do aumento da incidência de casos de VIH/SIDA (Gandy e Zumla, 2002; Carvalho *et al.*, 2007).

Em 1993, na tentativa de controlar a progressão da doença, a OMS declarou a TB como uma emergência mundial (Raviglione *et al.*, 1995) e recomendou a implementação da Estratégia de Tratamento Diretamente Observado (DOTS) que visa o compromisso dos governos com o programa de controlo; deteção dos casos por baciloscopia, principalmente nos sintomáticos respiratórios; tratamento padronizado de curta duração, diretamente observado; fornecimento regular de medicamentos antituberculosos e um sistema de informação para monitorizar os resultados (WHO, 1994).

A terapia padrão atual para o tratamento da TB consiste na administração oral diária de doses elevadas de rifampicina (RIF), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA) em combinação com etambutol (EMB), durante 2 meses, seguido de um período de manutenção com RIF e INH, por mais 4 meses (Riccardi *et al.*, 2009). A necessidade de um tratamento extenso com vários fármacos em concentrações elevadas e frequência diária, pode levar a muitos efeitos adversos e, conseqüentemente ao abandono do tratamento. Sem tratamento, a doença pode-se disseminar e levar ao aparecimento de resistência aos vários agentes terapêuticos (WHO, 2011).

Deste modo, o esforço para o desenvolvimento de novos fármacos, para superar os problemas associados à terapia convencional, é uma necessidade urgente, estando atualmente já algumas moléculas a ser ensaiadas. Como o processo é muito moroso, os investigadores tentam encontrar alternativas (Pinheiro *et al.*, 2011). Uma estratégia bastante promissora consiste no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para veicular os princípios ativos já em uso na prática clínica, para o seu local de ação, principalmente os de primeira linha (Jain, 2008). Com as novas formulações espera-se conseguir aumentar a eficácia dos agentes, evitando a sua degradação prematura e que consigam penetrar no interior das células que albergam as micobactérias e nos próprios bacilos (Cardona, 2006). Uma vez no meio intracelular, devem ser capazes de libertar o fármaco de modo controlado e continuado, mantendo as concentrações terapêuticas no local de infeção, e assim evitar a administração frequente, e inclusive reduzir a duração do tratamento e os efeitos adversos (Briones *et al.*, 2008). Como consequência a taxa de

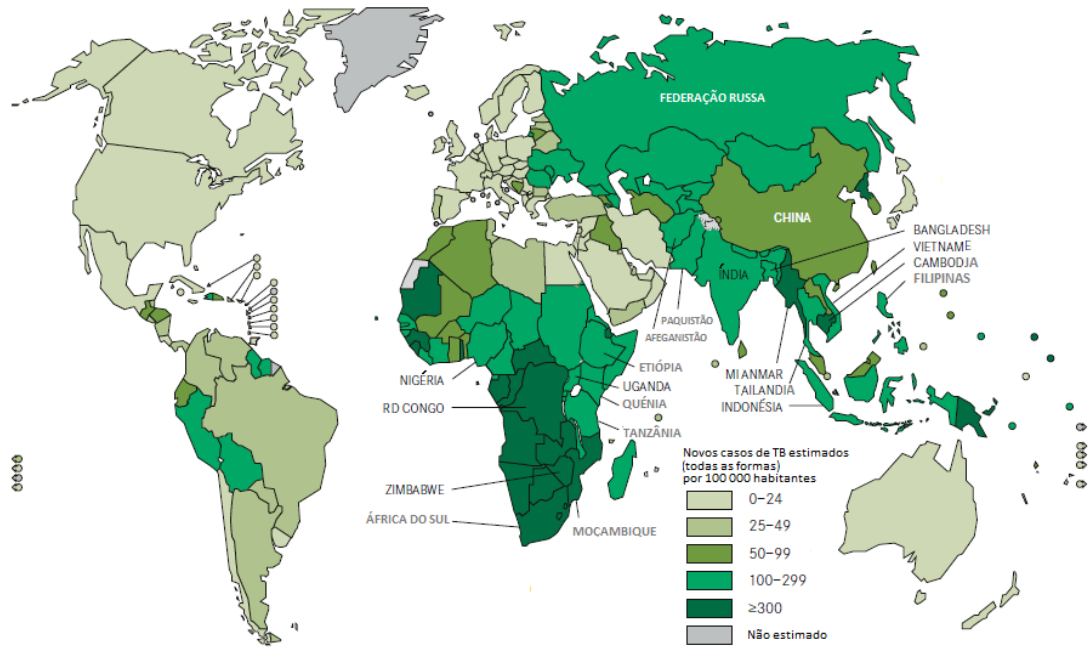
Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

abandono da terapia e o problema emergente da resistência do bacilo deverão diminuir (Ahmad e Khuller, 2008).

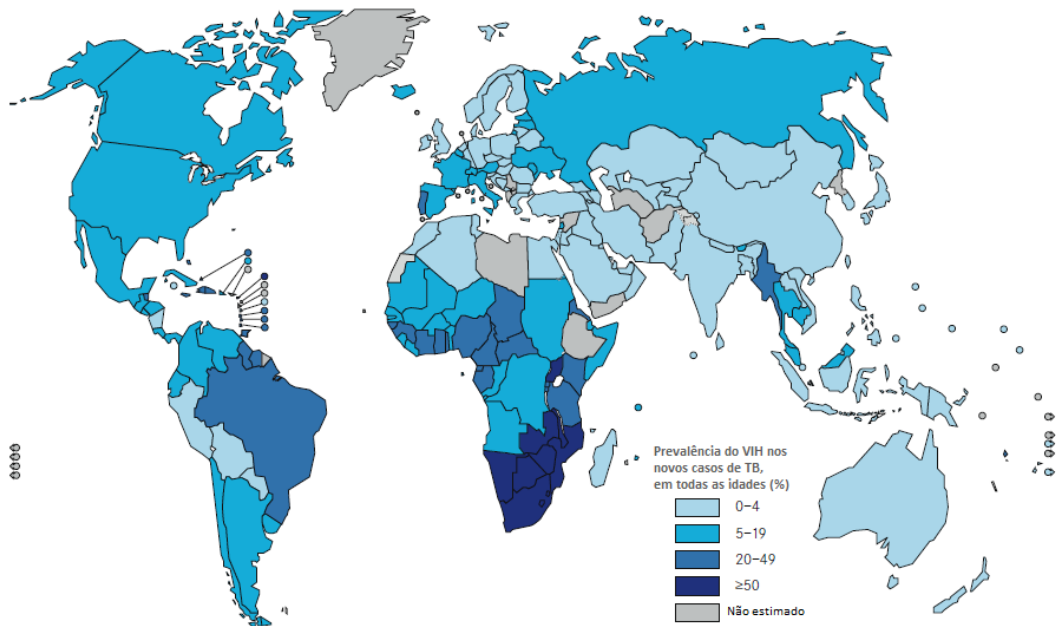
No trabalho de revisão bibliográfica efetuado, são referidos alguns dos trabalhos já realizados *in vitro* e *in vivo* sobre os novos sistemas terapêuticos em estudo para o tratamento da tuberculose, como os lipossomas, niossomas, micropartículas e nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas, administrados por diferentes vias, com o objetivo de conseguir um sistema altamente eficiente para veicular os fármacos. Eles refletem os esforços árduos dos investigadores no sentido de erradicar ou, pelo menos, amenizar a doença. Muitos evidenciaram uma enorme potencialidade, e talvez num futuro que se espera próximo, possam atingir o mercado. Será dado particular destaque à administração dos sistemas pela via pulmonar, a mesma via de entrada do *M. tuberculosis*, para combater os microrganismos diretamente no local e evitar os efeitos sistêmicos.

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA

A TB é a segunda principal causa de morte devido a uma doença infecciosa, a nível mundial, logo a seguir ao VIH (WHO, 2011). Em 2010, segundo a OMS, aproximadamente 1.4 milhões de pessoas morreram devido à doença. Destas, 0.35 milhões estavam co-infetadas com TB e VIH (WHO, 2011). Nesse mesmo ano, surgiram cerca de 8.8 milhões de novos casos (128 casos/100 000 habitantes) a nível mundial. A maioria ocorreu na Ásia (59%) e África (26%) e menor proporção na região europeia (5%) e nas Américas (3%) (Fig.1.2). Os países com o maior número de casos incidentes foram a Índia (2.0–2.5 milhões), a China (0.9–1.2 milhões), a África do Sul (0.40–0.59 milhões), a Indonésia (0.37–0.54 milhões) e o Paquistão (0.33–0.48 milhões (WHO, 2011). Desse total (8.8 milhões), 1.0-1.2 milhões de pessoas estavam também infetadas com o VIH. A maioria vive nos países da região africana (Fig.1.3), contribuindo para 82% dos casos de co-infecção TB/VIH (WHO, 2011). Relativamente à prevalência, 12.0 milhões de casos foram estimados (178 casos/100 000 habitantes), em que 650 000 eram TB multirresistente (MDR-TB).



**Figura 1.2** – Taxas de incidência de TB estimadas no ano de 2010 (adaptado de WHO, 2011).



**Figura 1.3** – Prevalência estimada do VIH nos novos casos de TB no ano de 2010 (adaptado de WHO, 2011).

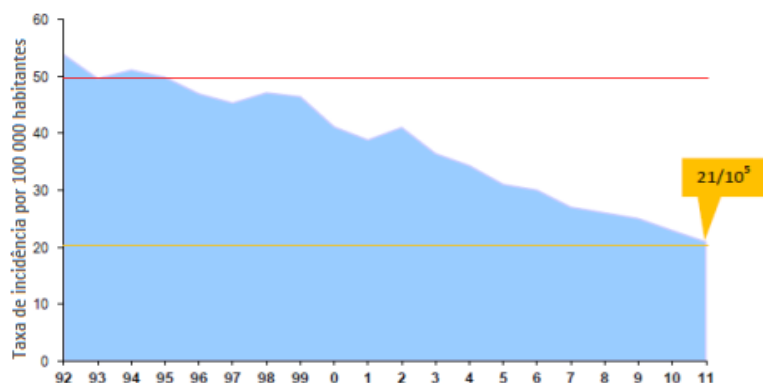
A TB é mais comum entre os homens do que em mulheres e afeta, principalmente adultos nos grupos etários economicamente produtivos (WHO, 2011).

Além destes números assustadores, as pessoas com a infecção latente constituem o reservatório oculto da doença, a partir do qual novos casos da doença ativa podem

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

emergir. A estimativa é que mais de 1/3 da população global esteja infetada com o *M. tuberculosis* latente (Jordão e Vieira, 2011).

Com respeito à situação em Portugal, em 2011, foram realizadas 2388 notificações de casos de TB, número que inclui novos casos e retratamentos. A incidência dos novos casos foi de 2231 (21/100 000 habitantes), representando uma redução de 9.6% relativamente à taxa de 2010, o que dá continuidade à diminuição que se verifica desde 2002 (Fig.1.4). O país fica assim perto da taxa de 20/100 000 habitantes que confere a classificação de baixa incidência (Direção-Geral da Saúde, 2012).



**Figura 1.4** - Taxa de incidência da tuberculose: evolução ao longo de 20 anos (1992-2011). Verifica-se um decréscimo sustentado desde 2002, sendo o valor preliminar, em 2011, de 21 novos casos por 100 mil habitantes. Acima da linha encarnada considera-se alta incidência, abaixo da linha laranja situam-se os valores de baixa incidência (Direção-Geral da Saúde, 2012).

As assimetrias na distribuição geográfica que anteriormente se verificavam, com os distritos de Lisboa, Porto, Setúbal e Braga a apresentarem elevados índices de morbidade, são já menos pronunciadas, não havendo atualmente nenhum distrito de alta incidência (50/100 000), refletindo o impacto das medidas adotadas para o controlo da doença (Direção-Geral da Saúde, 2012).

Em relação à prevalência da infeção do VIH, os dados de 2010, dão conta de 328 casos (12%), constituindo um decréscimo de 52% nos últimos 10 anos. Contudo é das mais elevadas da União Europeia e a maioria dos casos (82%), estão concentrados nas áreas metropolitanas de Lisboa e do Porto (Direção-Geral da Saúde, 2012).

## 1.2 ETIOLOGIA E TRANSMISSÃO

A TB é uma doença infecto-contagiosa provocada por microrganismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* que inclui estirpes de 5 espécies, *M.*

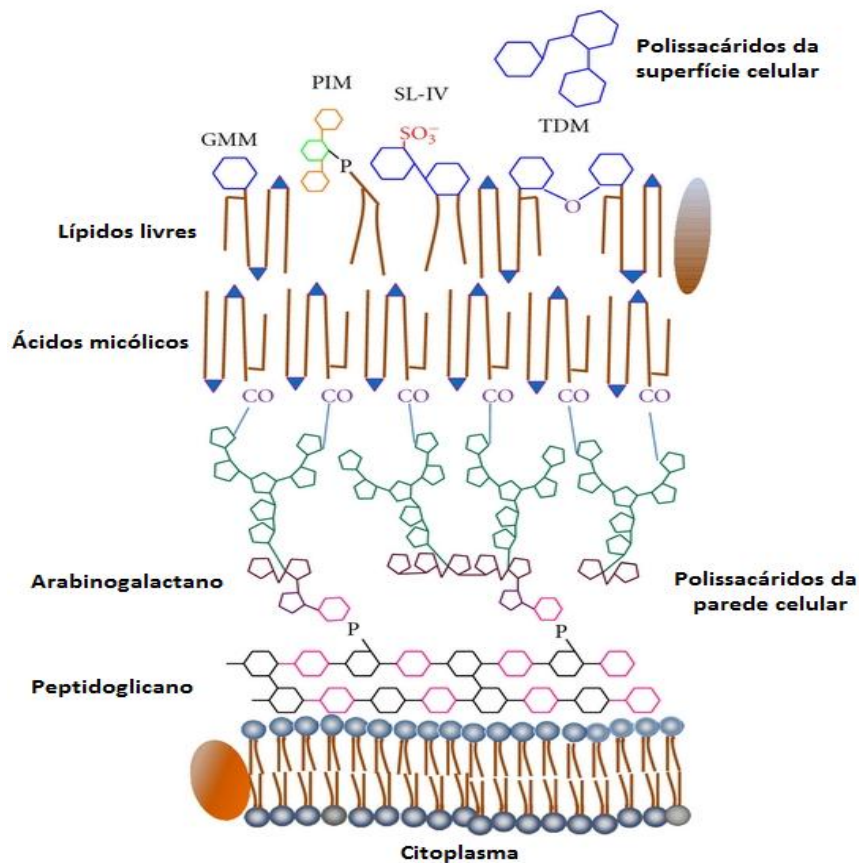
*tuberculosis*, *M. canetti*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* e 2 sub-espécies - *M. caprae* e *M. pinnipedi*. Pertencem ao género *Mycobacterium*, o único representante da família *Mycobacteriaceae* (Smith *et al.*, 2006). Os membros do complexo são organismos estreitamente relacionados, mas diferem significativamente na morfologia, bioquímica, hospedeiros e nas características da doença em animais experimentais (Brosch *et al.*, 2002). O membro mais importante é o *M. tuberculosis*, o principal agente etiológico da TB humana com um tropismo exclusivo o Homem (Sarkar e Suresh, 2011). O *M. bovis*, o agente etiológico da TB bovina, provoca apenas 5-10% dos casos de TB humana. O seu impacto nos humanos diminuiu drasticamente, após a descoberta da pasteurização (Jordão e Vieira, 2011). O terceiro membro do complexo com importância para o Homem é o *M. africanum*. Apesar de geograficamente circunscrito é responsável por metade dos casos de TB na África Ocidental (Jong *et al.*, 2010).

O *M. tuberculosis* foi isolado e identificado pela primeira vez, pelo médico alemão Robert Koch em 1882, daí ser também designado por bacilo de Koch. É considerado um bacilo Gram-positivo fraco; ligeiramente curvo de 1 a 4 µm de comprimento e 0.3 a 0.6 µm de largura; aeróbio obrigatório; intracelular facultativo que estabelece a infeção preferencialmente no sistema pulmonar, rico em oxigénio. Não apresenta cápsula nem flagelos; não produz esporos nem toxinas, pelo que a sua patogenicidade depende da capacidade de sobreviver e crescer no interior dos macrófagos do hospedeiro (Ducati *et al.*, 2006). Apresenta um crescimento lento, sendo necessárias 3-4 semanas para formar colónias visíveis, mesmo em meios de cultura especiais (Murray *et al.*, 2005). O crescimento lento contribui para os mecanismos que minimizam a resposta imunitária inata e adaptativa do hospedeiro, mas também é importante para desenvolver mecanismos de modo a permanecer num estado latente, durante muito tempo (Murray *et al.*, 2005).

A parede celular das micobactérias é complexa e extremamente invulgar, sendo constituída principalmente por peptidoglicano, arabinogalactano (polissacárido) e ácidos micólicos (ácidos gordos de cadeia longa com 60 a 90 carbonos). O peptidoglicano contém ácido *N*-glicolil-murâmico, em vez de ácido *N*-acetil-murâmico, geralmente presente nas bactérias (Brennan e Nikaido, 1995). Os ácidos micólicos estão ligados covalentemente às cadeias de arabinogalactano, o qual liga-se ao peptidoglicano através de pontes fosfodiéster. A parede celular contém ainda, alguns tipos de lípidos e proteínas livres, não covalentemente associados ao complexo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (Kaur *et al.*, 2009) (Fig.1.5). Muitos dos lípidos livres estão conjugados

com glúcidos, formando lipopolissacáridos anfifílicos. Os fosfolípidos ligados ao inositol e às manoses são característicos das espécies micobacterianas e designam-se por fosfatidilinositolmanósidos (PIM) e podem conter sucessivas adições de resíduos de manose ou arabinose, formando moléculas como o lipomanano (LM) e o lipoarabinomanano (LAM), característicos das micobactérias cuja localização precisa na parede celular não está ainda definida (Lopez-Marin, 2012). O LAM parece ter um importante papel como imunomodulador na resposta ao hospedeiro, protegendo a micobactéria dos seus mecanismos letais (Pitarque *et al.*, 2008).

O elevado teor em lípidos (cerca de 60%), principalmente ácidos micólicos (elevada hidrofobicidade), confere a estes microrganismos características como resistência à descoloração por álcool-ácido, daí a designação bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), permeabilidade baixa a antibióticos hidrofóbicos e extremamente baixa a substratos hidrofílicos e também resistência à desidratação (Glickman e Jacobs 2001).



**Figura 1.5** – Estrutura proposta para a parede celular do *M. tuberculosis*. A parede celular é composta por vários lípidos (a castanho e os grupos funcionais polares a azul) e glúcidos (hexágonos e pentágonos de várias cores). O peptidoglicano está conjugado ao arabinogalactano por ligações fosfodiéster e ao arabinogalactano estão também ligados os ácidos micólicos. Há também lípidos anfipáticos livres (GMM – glucose monomicolato, SL – Sulfatídeo, PIM – fosfatidilinositolmanósido, TDM – trehalose dimicolato ou fator corda) (adaptado de Lopez-Marin, 2012).

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

A TB atinge principalmente os pulmões, estimando-se que mais de 80% dos casos sejam de TB pulmonar (Pandey e Khuller, 2005a), mas pode afetar outros órgãos (TB extrapulmonar) ou ainda ocorrer de modo disseminado (TB disseminada ou miliar) (Pandolfi *et al.*, 2007). A propagação da doença ocorre apenas na forma pulmonar, as extrapulmonares não são transmissíveis (Campos, 2006).

A transmissão é feita de pessoa para pessoa através do ar, pela inalação de gotículas microscópicas (1 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro), contendo geralmente 2-3 bacilos do *M. tuberculosis*, expelidas por um indivíduo portador de TB pulmonar ou laríngea na forma ativa, ao tossir, espirrar ou falar. Estas gotículas minúsculas podem ficar suspensas no ar, durante minutos ou horas após serem eliminadas pelo indivíduo doente (Frieden *et al.*, 2003; du Toit *et al.*, 2006). Os bacilos que conseguem atingir os alvéolos pulmonares, ultrapassando os mecanismos de defesa inespecíficos do hospedeiro, como as barreiras mecânicas (cílios das narinas, o reflexo da tosse e do encerramento da glote, o sistema de transporte mucociliar) e a ação fagocitária das células do sistema imunitário inato (macrófagos e células dendríticas), podem iniciar o processo patológico e multiplicar-se dentro dos MAs (Edwards e Kirkpatrick, 1986; Pandolfi *et al.*, 2007). Geralmente, as gotículas menores que 0.5  $\mu\text{m}$  são expiradas, pois não têm inércia suficiente para sofrerem impacto e se depositarem no pulmão, enquanto as gotículas maiores que 5  $\mu\text{m}$  com mais bacilos, também não constituem fonte de infecção. Estas depositam-se no solo e, mesmo se forem inaladas, não conseguem atingir aos alvéolos, devido aos mecanismos de defesa do sistema respiratório, ficando retidas nas fossas nasais ou são transportadas pelo sistema mucociliar num movimento ascendente para a orofaringe, onde são deglutidas (Stead e Dutt, 1989).

Vários fatores influenciam a probabilidade de transmissão das bactérias, como o número de bacilos nas gotículas, a virulência dos bacilos, a sua exposição à luz ultravioleta (UV) e o grau de ventilação (Knechel, 2009).

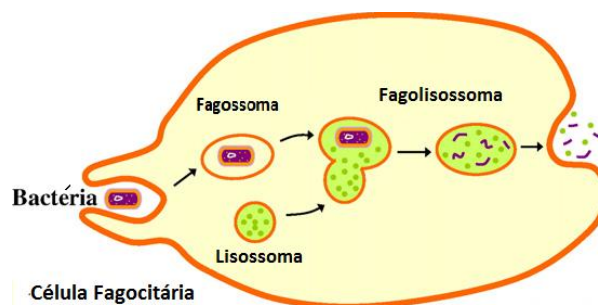
### **1.3 PATOGÊNESE**

A TB é dividida em primária (primoinfecção) e secundária. A forma primária ocorre em indivíduos que não estiveram anteriormente em contato com o bacilo, sendo, por isso, mais frequente em crianças. A forma secundária desenvolve-se a partir de uma nova infecção (reinfeção exógena) ou da reativação de bacilos latentes (reinfeção endógena) (Bombarda *et al.*, 2001).

A infecção primária de um hospedeiro pelo *M. tuberculosis* tem início após a inalação de gotículas com um pequeno número de bacilos (Kaufmann, 2001). A maior parte dos bacilos é, geralmente, retida pelos mecanismos físicos de defesa do sistema respiratório, como a tosse e a eliminação mucociliar, mas as bactérias que conseguem contorná-los e atingir os alvéolos pulmonares, são rapidamente capturadas, principalmente, pelos MAs (sistema imunitário inato), o que constitui uma oportunidade para o sistema imunitário destruir as micobactérias e evitar a infecção (Jensen *et al.*, 2005).

O processo da fagocitose realizado pelos macrófagos inicia uma cascata de eventos que pode culminar na contenção bem-sucedida da infecção, progredindo para TB latente ou pode haver progressão para a doença ativa, designada por TB primária progressiva (Frieden *et al.*, 2003). O resultado é essencialmente determinado pela interação entre a resposta do sistema imunitário do hospedeiro e a virulência bacteriana (Crevel *et al.*, 2002). No geral, uma proporção relativamente pequena (5-10%) de pessoas infetadas irá desenvolver a doença ativa. No caso de infecção pelo VIH a probabilidade é bastante superior (WHO, 2011).

Vários recetores dos macrófagos parecem estar envolvidos na entrada das micobactérias para o meio intracelular, como os recetores do complemento, recetores de manose, recetores para fração Fc das imunoglobulinas e recetores *Toll like* (TLR) (Crevel *et al.*, 2002). Na fagocitose do bacilo (Fig.1.6), ocorre a fusão do fagossoma com o lisossoma, constituindo o fagolisossoma, onde o bacilo fica sujeito à ação do pH ácido, de intermediários reativos de oxigénio (ROI) e de azoto (RNI), enzimas lisossômicas e de citocinas que o destroem (Briones *et al.*, 2008).



**Figura 1.6** - Fagocitose de microrganismos (adaptado de Briones *et al.*, 2008).

Contudo, a micobactéria tem mecanismos para ultrapassar a maioria dos mecanismos da defesa inata do hospedeiro, o que permite a sua sobrevivência e replicação nos fagossomas. Uma das estratégias do bacilo consiste na inibição da fusão

dos fagossomas infetados com os lisossomas (Sinai e Joiner, 1997). Assim, nos estádios iniciais da infeção, uma parte dos bacilos é eliminada, mas outros podem contornar as defesas do hospedeiro e multiplicarem-se no interior dos macrófagos, levando à destruição destas células e à infeção de novos macrófagos, atraídos para o local da infeção. A partir deste foco pode ocorrer a sua disseminação por via linfática e, posteriormente pela via hematogénica para infetar outros locais, o que pode resultar em TB disseminada ou nas formas pulmonar e extrapulmonar da doença (Russel, 2007).

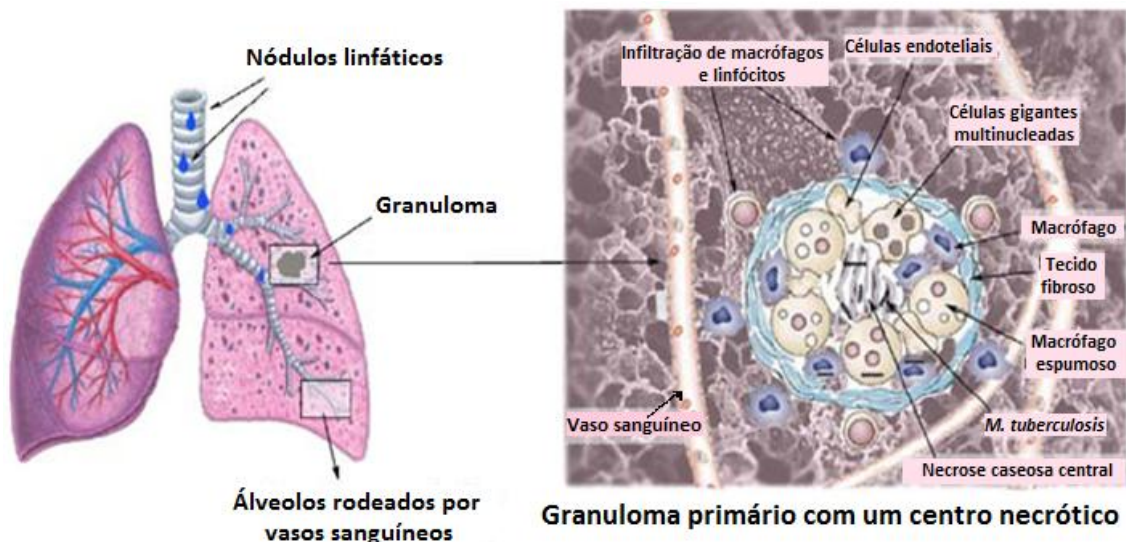
Independentemente de se a infeção é controlada ou progride, no início há a produção de citocinas pelos macrófagos (Crevel *et al.*, 2002), como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). As citocinas atraem para o local da infeção neutrófilos, monócitos, células dendríticas, macrófagos ativados e linfócitos T (principalmente CD4+). Os linfócitos T constituem a imunidade mediada por células (Russel, 2007). Os antígenos micobacterianos presentes nos fagossomas são processados e apresentados na superfície dos macrófagos e das células dendríticas às células T CD4+. Ocorre também o processamento de antígenos no citosol e a apresentação de péptidos micobacterianos às células T CD8+ (Crevel *et al.*, 2002). Os microrganismos continuam a crescer até atingirem um número suficiente para desencadear completamente a imunidade celular. Na maioria dos indivíduos infetados, a imunidade celular contra o *M. tuberculosis* desenvolve-se entre 2-12 semanas após a infeção e está associada com um resultado positivo no teste cutâneo de tuberculina (Ulrichs e Kaufmann, 2006). Na infeção pelo *M. tuberculosis* ocorre uma intensa resposta das células T CD4+ que segregam várias citocinas, sendo o IFN- $\gamma$  uma das mais importantes. É responsável pela ativação de outros macrófagos e está envolvido na formação e manutenção de uma estrutura intimamente associada à doença, que se denomina granuloma (Schluger, 2001).

Em pessoas com a imunidade mediada por células relativamente intacta, a próxima etapa defensiva será a formação de granulomas (Fig.1.7), que constituem a principal característica histopatológica da TB. Os granulomas envolvem os microrganismos, criando um microambiente que parece limitar a replicação e a propagação das micobactérias e fornece um ambiente para a comunicação celular do sistema imunitário (Saunders e Britton, 2007). Contudo, recentemente Davis e Ramakrishnan (2009) forneceram evidências de que o granuloma pode facilitar a disseminação da infeção, em vez de proteger o hospedeiro.

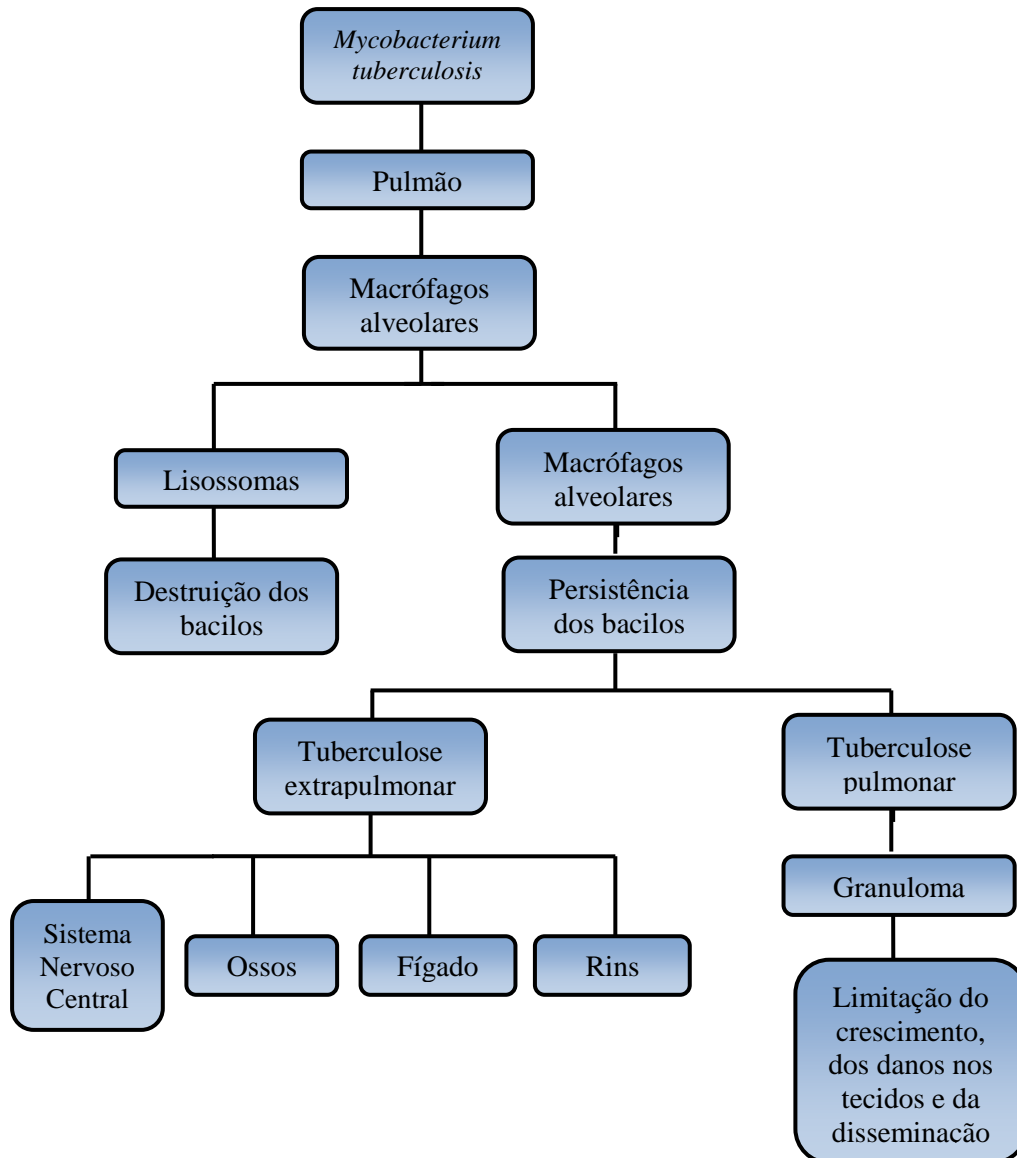
O granuloma é constituído por um núcleo necrótico central, onde estão os macrófagos infetados, rodeado por camadas concêntricas de macrófagos, linfócitos T e

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

B, neutrófilos, células epitelioides, macrófagos espumosos, células gigantes de Langhans multinucleadas e componentes da matriz extracelular. Posteriormente, o granuloma pode tornar-se fibroso e calcificado (Muttill *et al.*, 2009). A necrose no centro do granuloma está relacionada com a libertação de substâncias citotóxicas pelos linfócitos T (Saunders e Britton, 2007). Após 2-3 semanas, o ambiente necrótico assemelha-se ao aspeto de um queijo, daí a designação de necrose caseosa. Este meio é adverso para o *M. tuberculosis*, caracterizando-se por baixos níveis de oxigénio, pH ácido e conteúdo nutricional limitado, pelo que o bacilo diminui a atividade metabólica e fica num “estado latente”, condição em que pode permanecer durante anos, ou até mesmo durante a vida toda do hospedeiro, sem ocorrerem sintomas clínicos da doença (Ulrichs e Kaufmann, 2006).



**Figura 1.7** – Localização e morfologia de um granuloma num pulmão doente (adaptado de Muttill *et al.*, 2009).



**Figura 1.8** - Patogênese da tuberculose (adaptado de Pinheiro *et al.*, 2011)

Estima-se que 2 bilhões de pessoas (1/3 da população mundial) alberguem a infecção latente do *M. tuberculosis* sem quaisquer manifestações clínicas (Lin e Ottenhoff, 2008). Contudo, em pessoas menos imunocompetentes, apesar da formação do granuloma ser iniciada, a infecção normalmente não pode ser contida e progride para TB ativa. O tecido necrótico sofre liquefação e a parede fibrosa perde a integridade, constituindo um excelente meio para a proliferação das micobactérias (Dheda *et al.*, 2005; El-Sadr e Tsiouris, 2008). Os locais para a reativação são aqueles onde há elevada tensão de oxigênio, como o pulmão, o rim, ossos e o sistema nervoso central (Mutil *et al.*, 2009).

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Entre os fatores de risco para a diminuição da imunidade, contam-se a idade avançada, a desnutrição, o tabagismo, a diabetes, neoplasias, medicação imunomoduladora, contudo a infecção pelo VIH é a principal responsável (Muttill *et al.*, 2009). Na infecção por este vírus, o número de linfócitos T CD4+ circulantes diminui, e ocorre a sua disfunção. Como o mecanismo de defesa do hospedeiro contra a TB baseia-se na imunidade celular, o VIH é assim um forte indutor para a doença clínica (Nunn *et al.*, 2007).

## 1.4 DIAGNÓSTICO

A radiografia do tórax (Fig.1.9) constitui, em muitas ocasiões, a primeira abordagem, pelo baixo custo e pelas informações que proporciona (Capone *et al.*, 2006). Na TB pulmonar verificam-se, quase sempre alterações na radiografia ao tórax que podem apresentar os infiltrados com cavitação característicos, nos lobos superiores e médios dos pulmões (Thrupp *et al.*, 2004). Contudo, em doentes idosos e doentes com formas avançadas de infecção pelo VIH ocorrem frequentemente as formas não cavitárias e podem ter infiltrados nos lobos inferiores (Chang *et al.*, 2008).



**Figura 1.9** – Radiografia ao tórax na posição pósterio-anterior, onde se podem ver opacidades heterogêneas em ambos os pulmões (Bombarda *et al.*, 2001).

Apesar das alterações radiológicas poderem sugerir TB, elas não diagnosticam a doença (Knechel, 2009). Outro método de imagem importante é a tomografia computadorizada (Capone *et al.*, 2006).

Os exames micobacteriológicos são os exames de referência no diagnóstico da TB. O exame direto à expetoração é, normalmente, usado na avaliação inicial dos casos

suspeitos de TB pulmonar e, tem por base, as características da parede celular das micobactérias, com elevado teor em lípidos (ácidos micólicos), conferindo-lhes resistência à descoloração por álcool-ácido (Bento *et al.*, 2011). Um dos métodos mais usados é a técnica de Ziehl-Neelsen, baseada na coloração de um esfregaço de expetoração pela fucsina básica, em que o corante dá aos BAAR uma cor avermelhada após lavagem por álcool-ácido (Bento *et al.*, 2011). O exame direto é relativamente rápido, de fácil execução e baixo custo, daí ser muito usado, principalmente em áreas de recursos mais limitados, para diagnóstico e monitorização terapêutica (WHO, 2010). Contudo, apresenta baixa sensibilidade e não é específico para o *M. tuberculosis*, porque outras micobactérias também são álcool-ácido resistentes (Knechel, 2009).

O exame mais importante para diagnosticar a TB é o isolamento e a identificação do *M. tuberculosis* num meio de cultura e é o único que confirma a viabilidade das micobactérias (Takahashi *et al.*, 2008). Mesmo nos pacientes assintomáticos ou com radiografia de tórax normal, um resultado cultural positivo identifica um caso ativo. É uma técnica mais sensível do que o exame direto, mas como o bacilo apresenta crescimento lento, podem ser necessárias várias semanas para se obter um resultado positivo (Bento *et al.*, 2011). Este método permite avaliar a sensibilidade aos fármacos tuberculostáticos e a eficácia da terapia.

As técnicas mais recentes para uma deteção mais rápida e precisa do *M. tuberculosis*, diretamente da amostra ou de uma cultura, incluem os testes de amplificação dos ácidos nucleicos (TAAN), como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que pode ser usada para diferenciar o *M. tuberculosis* de outras micobactérias com base na informação genética. Obtêm-se resultados em poucas horas, apesar do custo elevado (Martire, 2009), mas não substituem os exames micobacteriológicos diretos ou culturais. Devem antes ser interpretados em conjunto (Ling *et al.*, 2008). Além disso, não podem ser usados para monitorizar a resposta à terapêutica, pois o ácido desoxirribonucleico (DNA) persiste, mesmo após a morte do bacilo, durante um longo período de tempo (Michos *et al.*, 2006).

Quanto ao estudo bioquímico para fazer o diagnóstico, pode-se referir o doseamento da adenosina desaminase (ADA), um marcador inflamatório inespecífico libertado por linfócitos, macrófagos e neutrófilos, que pode ser avaliado em vários líquidos biológicos (líquido pleural, pericárdico, peritoneal, líquido cefalorraquidiano (LCR)) e em produtos paucibacilares (pobres em bacilos), onde o isolamento do *M. tuberculosis* pode ser complicado. É um teste simples e barato (Pai *et al.*, 2008), mas

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

não é seletivo, porque outras patologias, como infecções bacterianas e neoplasias, podem também provocar a elevação da enzima (Burgess *et al.*, 1996).

Com respeito à TB latente, o diagnóstico pretende evitar a sua evolução para a tuberculose ativa. Na forma latente, as amostras da expectoração são negativas para o bacilo, as radiografias ao tórax são tipicamente normais e os pacientes também não apresentam sintomas e não transmitem o bacilo (Knechel, 2009). O método mais usado para o rastreio é o teste da tuberculina ou de Mantoux, mas não deve ser usado para o diagnóstico e consiste na injeção intradérmica de proteínas purificadas, derivadas dos bacilos (Goldrick, 2004). Numa pessoa infetada anteriormente e que desenvolveu imunidade celular a estes antígenos tuberculínicos, a injeção origina um processo inflamatório do tipo retardado, após 48-72 horas, mediado por células T. Estas produzem citocinas que atraem para o local várias células (linfócitos T CD4+ e CD8+, monócitos e macrófagos) que libertam mediadores produzindo edema e eritema. O que se avalia é a induração e não o eritema, porque este resulta de reação alérgica, não tendo valor no diagnóstico (Duarte *et al.*, 2007). Apesar da relativa facilidade de execução e do baixo custo, há possibilidade de ocorrência de falsos-negativos em pacientes imunocomprometidos ou mal nutridos, porque não conseguem desenvolver uma resposta imunitária, e falsos-positivos, devido às reações cruzadas, pois uma parte significativa dos antígenos que constituem a tuberculina (*purified protein derivate* (PPD)) é partilhada por outras micobactérias não tuberculosas ou pelo BCG (Anderson *et al.*, 2006).

Mais recentemente foram desenvolvidos outros testes mais específicos para a tuberculose latente, os *interferon gamma release assays* (IGRA), como o teste comercial QUANTIFERON<sup>®</sup>-TB Gold, baseado na secreção de duas proteínas antigénicas, a *early secretory antigenic target* 6-kDa (ESAT-6) e *culture filtrate protein* 10-kDa (CFP10) pelo *M. tuberculosis* que não se encontram no BCG, nem na maioria das micobactérias não tuberculosas. Os linfócitos T previamente sensibilizados pelo *M. tuberculosis*, produzem IFN- $\gamma$  em resposta a estes antígenos, o qual pode ser quantificado por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Palomino, 2005; Direção-Geral de Saúde, 2007). Os resultados são obtidos em menos de 24 horas e pode ser usado para detetar a TB ativa e latente (Knechel, 2009).

Virtualmente, qualquer tecido pode ser atingido pela TB, por isso o tipo de amostras a recolher depende do local da doença. Os produtos extrapulmonares analisados com maior frequência são os aspirados, as biópsias, a urina e os líquidos

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

estéreis, como o líquido pleural, o líquido pericárdico, o líquido peritoneal, o LCR e o líquido sinovial (Bento *et al.*, 2011). Normalmente, os produtos extrapulmonares são (paucibacilares, o que dificulta a colheita das amostras (WHO, 2007). Na suspeita de TB disseminada, a pesquisa do *M. tuberculosis* deve ser feita em amostras de sangue ou medula óssea (Bento *et al.*, 2011).

## 1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO

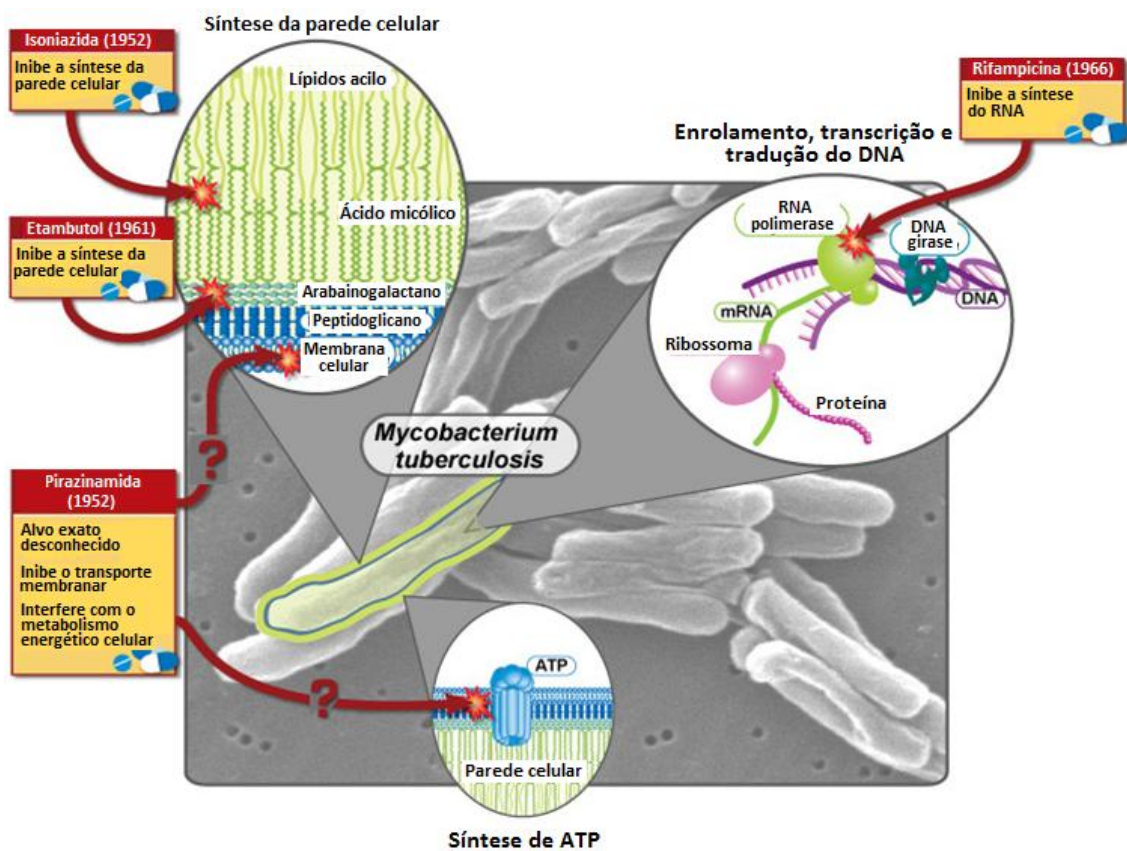
Alguns pacientes com TB pulmonar não apresentam nenhum sintoma da doença, enquanto outros são apenas ligeiros e, por isso ignorados. Contudo, na maioria dos casos, os sinais e sintomas mais frequentes são tosse seca e contínua no início da doença (Wildner *et al.*, 2011). Com o desenvolvimento da infecção, o doente produz expectoração que persiste durante mais de três semanas e transforma-se, na maioria das vezes, numa tosse produtiva purulenta ou hemoptise (expectoração com sangue), fadiga, febre baixa, geralmente vespertina, sudorese noturna abundante, palidez, perda de peso, falta de apetite, anorexia, rouquidão e prostração. Nos casos graves, podem apresentar dispneia, hemoptise maciça, colapso do pulmão e empiema pleural (pus na cavidade pleural) e dor torácica (Wildner *et al.*, 2011). Quanto às formas extrapulmonares, embora qualquer local do organismo possa ser afetado, as formas mais frequentes são a pleural, linfática, osteoarticular, peritoneal, pericárdica, ganglionar, urogenital, meníngea, oftálmica, cutânea e intestinal. Os sinais e sintomas vão depender do órgão afetado (Wildner *et al.*, 2011).

A infecção causada pelo *M. tuberculosis* é, geralmente, difícil de tratar devido à sua resistência intrínseca à maioria fármacos, atribuída em grande parte, à baixa permeabilidade da parede celular pela composição rica em lípidos, principalmente ácidos micólicos. Estes conferem pouca permeabilidade a antibióticos hidrofóbicos e extremamente baixa a compostos hidrofílicos (Lopez-Marin, 2012).

Os objetivos da terapia da TB são assegurar a cura sem que ocorra a recaída, parar a transmissão do bacilo, prevenir o desenvolvimento de resistência aos fármacos e evitar a morte (Frieden *et al.*, 2003). Os agentes antituberculosos são selecionados para matarem rapidamente os bacilos que metabolizam ativamente nas cavidades dos pulmões, destruir os que se replicam menos ativamente no ambiente ácido e anóxico das lesões caseosas pulmonares e matar os quase latentes que podem causar uma recaída da doença. Os fármacos mais eficazes para obter estes resultados são, respetivamente, a

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

INH, a PZA e a RIF (Onyebujoh *et al.*, 2005). Assim, atualmente, a quimioterapia padrão recomendada pela OMS para tratar a TB não resistente, consiste em 2 meses de terapia intensiva, diretamente observada usando uma combinação de quatro fármacos de primeira linha, INH, RIF, PZA, junto com o EMB, para evitar o desenvolvimento de resistência à RIF e INH, seguido de um período mínimo de 4 meses, apenas com INH e RIF (fase de manutenção) (Riccardi *et al.*, 2009), em que a RIF irá matar os bacilos dormentes residuais e a INH destrói os mutantes resistentes à RIF que iniciem a replicação (Fig.1.10 e Tabela 1.1) (Onyebujoh *et al.*, 2005). A introdução da RIF, o mais potente dos fármacos contra a TB, revolucionou a terapia, permitindo reduzir a sua duração para 6 meses.



**Figura 1.10** – Mecanismos de ação dos antibióticos de primeira linha (adaptado de National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2012).

A quimioterapia da TB irá, provavelmente, sempre envolver um *cocktail* de fármacos, devido à natureza singular da bactéria, pois é difícil desenhar uma molécula única que possa, simultaneamente destruir as populações bacterianas que se replicam ativamente, as semi-latentes e as latentes (Sarkar e Suresh, 2011).

Contudo, o longo período de tratamento e a necessidade de vários fármacos em concentrações elevadas leva à fraca adesão dos doentes, principalmente por parte dos

grupos de risco como os toxicodependentes (Sarkar e Suresh, 2011). Além disso, após a fase inicial intensiva da terapêutica, quando os sintomas diminuem, muitos pacientes interrompem a medicação, sobretudo pelo preço elevado e efeitos tóxicos associados. As reações adversas mais frequentes são as reações de hipersensibilidade dérmica, toxicidade hepática e complicações neurológicas (Onyebujoh *et al.*, 2005). A RIF provoca uma condição semelhante a influenza, designada por síndrome de flu. As reações de hipersensibilidade dérmica são habitualmente, ligeiras, mas podem ocorrer formas mais graves e potencialmente fatais (incluindo o síndrome de síndrome Stevens–Johnson), especialmente em portadores do VIH (Onyebujoh *et al.*, 2005). Relativamente à toxicidade hepática, esta é induzida por todos os agentes de primeira linha, principalmente pela INH e é habitualmente ligeira, mas em casos raros, pode ocorrer hepatite fatal. As complicações neurológicas estão principalmente associadas à INH e podem ser evitadas pela toma de vitamina B6 (piridoxina) (Onyebujoh *et al.*, 2005). Além disso, alguns agentes antituberculosos inibem ou aumentam os efeitos de outros fármacos, o que tem sérias implicações clínicas (Piscitelli *et al.*, 2001), principalmente para doentes co-infetados pelo VIH. A maioria das interações reportadas envolve a RIF e outras rifamicinas, pois induzem os citocromos, enzimas envolvidas no metabolismo de muitos fármacos, reduzindo os níveis destes agentes (Yew, 2002).

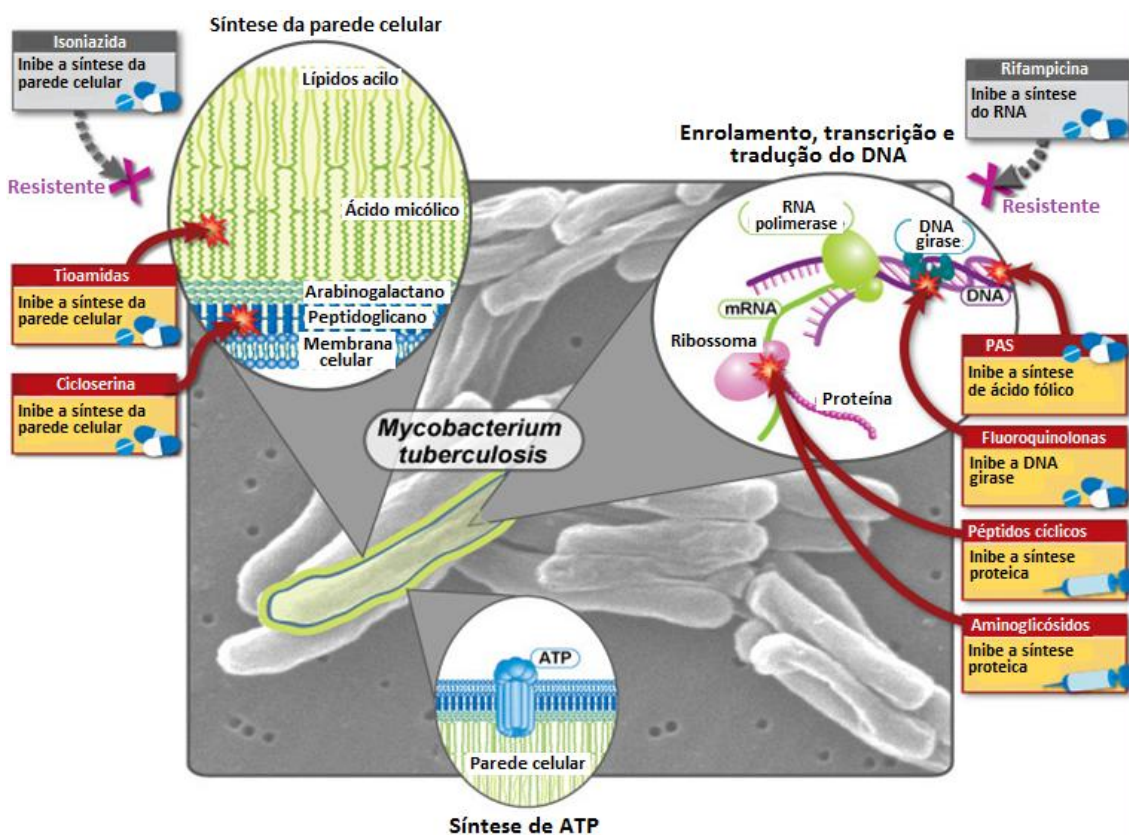
Outros problemas prendem-se com a toma de fármacos de baixa qualidade e erros na prescrição, que podem levar à recaída e disseminação da doença e também contribuem para a emergência de estirpes bacterianas resistentes (WHO, 2011).

A TB resistente a fármacos compreende várias categorias de resistência. A mono resistência, na qual o *M. tuberculosis* é resistente a um dos agentes de primeira linha, a TB multirresistente (MDR-TB) e a extensivamente resistente (XDR-TB) (Chakroborty, 2011). Na MDR-TB o bacilo apresenta resistência aos dois agentes principais de primeira linha, a INH e a RIF (Loddenkemper e Hauer, 2010). Os regimes recomendados para o tratamento de MDR-TB requerem, pelo menos 20 meses de tratamento com fármacos de segunda linha que são frequentemente, mais tóxicos, pouco tolerados e menos potentes, com taxas de cura entre 60-70% (WHO, 2011). É necessário também um elevado grau de cooperação do paciente e a taxa de abandono prematuro da terapêutica é maior do que na TB não resistente (Chiang e Yew, 2009).

Os fármacos de segunda linha são membros do grupo das fluoroquinolonas; agentes injetáveis, como os aminoglicósidos (canamicina (KAN) e amicacina (AMK)) e polipéptidos (capreomicina (CPM)) e outros como o ácido *para*-aminosalicílico (PAS),

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

cicloserina (DCS), etionamida (ETA) e protionamida (PTH) (Fig.1.11 e tabela 1.1) (Chakroborty, 2011). As fluoroquinolonas, aminoglicósidos e a capreomicina atuam na replicação do DNA e na síntese proteica e são os fármacos de segunda linha mais eficazes (Mukherjee *et al.*, 2004). Os antibióticos restantes têm atividade bacteriostática e são consideravelmente menos potentes, mais tóxicos e mais caros (Dorman e Chaisson, 2007). O aumento do uso destes agentes deu origem a estirpes XDR, definidas como micobactérias MDR que são também resistentes a pelo menos uma fluoroquinolona e a um dos agentes injetáveis (AMK, KAN, CPM) (Marriner *et al.*, 2011).



**Figura 1.11** – Mecanismos de ação dos antibióticos de segunda linha (adaptado de National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2012).

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

**Tabela 1.1** – Fármacos de primeira e segunda linha usados no tratamento da tuberculose (Haydel, 2010).

	<b>Fármaco</b>	<b>Classe/estrutura do antibiótico</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Atividade</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
<b>Fármacos de primeira linha</b>	Isoniazida	Piridina hidrazida	Oral	Bactericida	Inibe a síntese de ácido micólico (parede celular).
	Rifampicina (Rifampina)	Rifamicina	Oral	Bactericida	Inibe a síntese do RNA.
	Pirazinamida	Análogo nicotinamida	Oral	Bacteriostático/ Bactericida	O alvo exato é desconhecido. Interfere com a energética da membrana celular e inibe o transporte membranar.
	Etambutol	Derivado da etilenodiamina	Oral	Bacteriostático	Inibe a síntese de arabinogalactano (parede celular).
<b>Fármacos de segunda linha</b>	Estreptomicina	Aminoglicósido	Injeção i.m.	Bactericida	Inibe a síntese proteica.
	Canamicina/ Amicacina	Aminoglicósido	Injeção i.m.	Bactericida	Inibe a síntese proteica.
	Capreomicina	Polipéptido	Injeção i.m.	Bactericida	Inibe a síntese proteica.
	Levofloxacin	Fluoroquinolona	Oral ou i.v.	Bactericida	Inibe a replicação do DNA.
	Moxifloxacin	Fluoroquinolona	Oral ou i.v.	Bactericida	Inibe a replicação do DNA.
	Gatifloxacin	Fluoroquinolona	Oral ou i.v.	Bactericida	Inibe a replicação do DNA.
	Etionamida	Tioamida	Oral	Bacteriostático	Inibe a síntese do ácido micólico (parede celular).
	Cicloserina	Isoxazolidinona	Oral	Bacteriostático	Inibe a síntese do peptidoglicano (parede celular).
	Ácido <i>para</i> -aminosalicílico	Ácido salicílico	Oral	Bacteriostático	Inibe a síntese de ácido fólico.

DNA – Ácido desoxirribonucleico, i.m. – Intramuscular, i.v. – Intravenosa, RNA – Ácido ribonucleico

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Enquanto a MDR-TB pode ser tratada eficientemente com um regime de longa duração de antibióticos de segunda linha, a XDR-TB é difícil de tratar ou até mesmo intratável com os antibióticos disponíveis, particularmente os doentes imunocomprometidos (Haydel, 2010). A co-infecção TB/VIH complica ainda mais a situação, devido às interações entre os antirretrovirais e os antituberculosos e ao risco aumentado de efeitos adversos (Haydel, 2010).

Têm sido feitos progressos significativos ao longo dos últimos anos, no sentido de desenvolver novos agentes. A descoberta da sequência completa do genoma da bactéria da TB ajudou a identificar vários alvos importantes e felizmente, novos fármacos estão em ensaios clínicos (Sarkar e Suresh, 2011). Provavelmente alguns serão aprovados até 2015 (Lienhardt *et al.*, 2010). Contudo, o processo é muito caro e moroso, pelo que é de grande importância a melhoria das opções existentes com novos sistemas terapêuticos, em termos de diminuir o período de tratamento, reduzir a frequência de administração e da toxicidade associada e também atingir a população de bactérias latentes para controlar as estirpes suscetíveis a fármacos e assim minimizar a emergência de MDR-TB e XDR. Além disso, os sistemas desenvolvidos também devem ser apropriados para o tratamento em conjunto do VIH (Mwaba *et al.*, 2011, Sarkar e Suresh, 2011).

## **2. VEICULAÇÃO DOS FÁRMACOS EM NOVOS SISTEMAS TERAPÊUTICOS**

A investigação de novos sistemas terapêuticos para veicular os fármacos usados atualmente, representa uma estratégia alternativa e parece ser muito promissora para superar alguns dos problemas associados ao tratamento convencional (Jain, 2008), como a redução da eficácia devido à degradação dos fármacos antes de atingirem os tecidos alvo e a dificuldade em penetrarem adequadamente no interior dos macrófagos infectados e dos granulomas (os reservatórios de bactérias latentes) e em atravessar a complexa parede celular das micobactérias (Cardona, 2006). Podem assim ocorrer concentrações sub-terapêuticas no meio intracelular, com o aparecimento subsequente de resistência (Adams *et al.*, 1999). Há, então, uma grande necessidade de administrar doses elevadas e frequentes para manter as concentrações terapêuticas, durante um maior período de tempo, conduzindo a efeitos adversos localizados e sistêmicos (Briones *et al.*, 2008; Gaspar *et al.*, 2008a).

As novas formulações têm mostrado capacidade para transportar os antibióticos seletivamente para as células fagocitárias e aumentar a sua penetração no meio intracelular para tratar a infecção (Briones *et al.*, 2008). Após atingirem a corrente sanguínea, os sistemas de transporte devem ser rapidamente reconhecidos e retirados da circulação pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) e, uma vez no interior das células, devem prolongar a libertação do fármaco, de modo a obter concentrações terapêuticas no local da infecção, por longos períodos de tempo, reduzindo a frequência de administração e até a duração do tratamento (Briones *et al.*, 2008). Ao serem transportados nestes sistemas, os agentes terapêuticos exercem as suas ações farmacológicas e toxicológicas quando atingem o SFM, diminuindo assim a incidência de efeitos adversos sistêmicos associados à terapia convencional (Severino *et al.*, 2011). Estas melhorias poderão fazer aumentar a adesão ao tratamento (Ahmad e Khuller, 2008).

Os transportadores devem ser biodegradáveis, biocompatíveis e permanecer estáveis *in vivo* (Roser *et al.*, 1998) e devem também resolver os problemas de solubilidade e de estabilidade dos princípios ativos e evitar a sua degradação prematura antes de atingir o alvo. Foi já descrito que, em alguns casos, os transportadores atuam sinergicamente com os mecanismos bactericidas, estimulando os intermediários reativos intracelulares, o que aumenta ainda mais a eficiência da terapia (Prior *et al.*, 2002; Gaspar *et al.*, 2008a; Dube *et al.*, 2012). Podem também ser úteis na redução das interações fármaco-fármaco, entre os agentes antituberculosos e os antirretrovirais (Burman, 2005).

Os sistemas podem transportar o agente terapêutico por veiculação passiva ou ativa (Briones *et al.*, 2008). A passiva está relacionada com a capacidade inerente dos macrófagos capturarem os transportadores dos fármacos, reconhecendo-os como substâncias estranhas ao organismo. Na ativa são usadas modificações na superfície das formulações, para aumentar a sua afinidade e ocorrer a interação específica com as células alvo (Briones *et al.*, 2008), pela conjugação de ligandos, reconhecidos pelos recetores específicos das células fagocitárias. Estes facilitam a sua internalização por endocitose mediada pelos recetores. Os recetores de manose/fucose e os *scavenger* são os mais estudados. Uma prática comum, consiste no uso de glicoproteínas ou polissacáridos com terminais de manose ou fucose que se ligam aos recetores de manose e de macromoléculas polianiónicas com afinidade para os recetores *scavenger* (Mukhopadhyay e Basu, 2003). Outra alternativa é a fixação de anticorpos específicos

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

do *M. tuberculosis*, aumentando a seletividade para as células infetadas (Briones *et al.*, 2008).

Um aspeto primordial é o facto dos países com TB endémica, onde há uma maior necessidade de um tratamento mais eficaz, terem poucos recursos e como o desenvolvimento de novas formulações é caro, pode limitar a continuidade dos estudos e, posteriormente a produção em larga escala (Nuermberger *et al.*, 2010).

Entre os novos sistemas investigados para a terapêutica da TB contam-se os lipossomas, niossomas, micro e nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, micelas poliméricas e os dendrímeros (Severino *et al.*, 2011). Na revisão bibliográfica aqui efetuada vão ser apenas referidos alguns dos estudos com lipossomas, niossomas, micro e nanopartículas poliméricas e às nanopartículas lipídicas sólidas, por serem os mais estudados e terem produzido os resultados mais relevantes para o combate à doença. Os trabalhos serão apresentados de acordo com as várias vias de administração e também em função do tipo de veiculação (passiva ou ativa) que proporcionam.

Entre as várias vias estudadas para veicular estas novas formulações estão a oral, a parenteral e a pulmonar. A administração oral é, no geral, a mais conveniente, segura e barata, e portanto a mais frequentemente usada (Manual Merck, 2009). Contudo, apresenta várias limitações, porque outros fármacos e alimentos podem afetar o modo de absorção dos agentes terapêuticos, após a toma. Por isso, alguns fármacos apenas devem ser ingeridos em jejum, outros devem ser tomados com alimentos e para outros ainda, a via oral é mesmo contraindicada. A absorção dos princípios ativos administrados por esta via inicia-se na boca e no estômago, mas ocorre principalmente no intestino delgado (Medipedia, 2012). Para atingirem a grande circulação, têm de superar o ambiente ácido e as enzimas gástricas sem sofrerem degradação e têm de atravessar a parede intestinal e passar pelo fígado, onde podem ser extensivamente metabolizados (efeito de primeira passagem), diminuindo a quantidade que atinge a circulação sanguínea. Alguns fármacos podem irritar o trato gastrointestinal e danificar o revestimento do estômago e do intestino delgado, favorecendo o desenvolvimento de úlceras (Medipedia, 2012).

Em relação à administração parenteral, envolve a injeção de um fármaco diretamente numa veia (intravenosa (i.v.)), músculo (intramuscular (i.m.)), artéria (intrarterial), cavidade abdominal (intraperitoneal (i.p.)), coração (intracardiaca) ou no tecido adiposo por baixo da pele (subcutânea (s.c.)), pelo que não há efeito de primeira

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

passagem hepático. É usada para agentes terapêuticos que são de difícil absorção ou que não são estáveis no trato gastrointestinal e também quando é necessário um início rápido de ação e permite um melhor controlo sobre a dose dispensada ao organismo. No caso da via i.v., em que a injeção é realizada diretamente na corrente sanguínea, o fármaco não passa pelo processo de absorção, pelo que a biodisponibilidade é rápida e completa (Manual Merck, 2009).

Contudo, a via parenteral não é geralmente bem aceite pelo paciente, por ser dolorosa e invasiva. Necessita, na maior parte das vezes, de pessoal especializado e requiere condições de assepsia rigorosas para evitar a transmissão de doenças infecto-contagiosas. Além das soluções, também as seringas e as agulhas precisam de ser estéreis e o local onde será feita a injeção tem de ser desinfetado (Manual Merck, 2009). Por ser necessário recorrer a métodos de esterilização, esta via possui um custo elevado e tendo em conta que a TB é especialmente problemática nos países com fracos recursos, a via parenteral poderá ser difícil de aplicar nestes países.

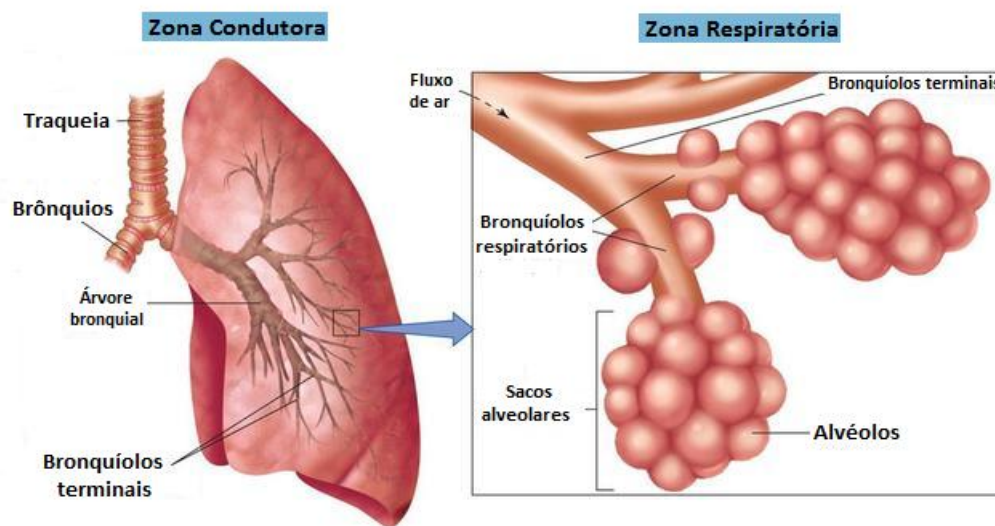
Em seguida, será dado particular destaque à via pulmonar, uma via alternativa às vias convencionais (oral e parenteral), na qual os fármacos são veiculados pela mesma via pela qual o *M. tuberculosis* entra no organismo, alojando-se depois, principalmente nos macrófagos alveolares. Pretende-se assim combater os microrganismos diretamente no local e evitar os efeitos sistémicos.

## **2.1 O INTERESSE DA VEICULAÇÃO LOCAL**

Como referido anteriormente, o bacilo da TB estabelece-se nos humanos, após a inalação de gotículas de aerossóis geradas pelos indivíduos infetados. Sendo o pulmão o local principal onde a infeção se estabelece, é de todo o interesse veicular os fármacos antituberculosos pela via pulmonar, na forma de aerossol, de modo a obter concentrações elevadas nos pulmões e atingir diretamente os MAs (Misra *et al.*, 2011). Assim, além das vias convencionais (oral e parenteral), os investigadores têm dado particular destaque a esta via de administração. Para compreender melhor o processo de veiculação para os pulmões é necessário o conhecimento profundo da anatomia e fisiologia do sistema respiratório, de modo a conseguir produzir uma formulação que consiga ultrapassar as barreiras do organismo.

## 2.1.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

O sistema respiratório tem como função principal promover as trocas gasosas contínuas entre o ar inspirado e o sangue, fornecendo oxigênio ao sangue e removendo deste o dióxido de carbono (Kurmi *et al.*, 2010) e compreende a zona condutora e a zona respiratória (Fig.2.1) (Beck-Broichsitter *et al.*, 2011). Na primeira estão incluídos a cavidade nasal, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos. Na zona respiratória ocorrem as trocas gasosas e dela fazem parte os bronquíolos respiratórios, os ductos, os sacos alveolares e os alvéolos. Os bronquíolos terminais representam a passagem para a região respiratória (Patil e Sarasija, 2012).



**Figura 2.1** – Representação parcial da zona condutora e da zona respiratória (adaptado de Rausch e Kortleever, 2011).

As vias aéreas têm várias funções essenciais, como o aquecimento, humedecimento e filtração do ar inalado. O aquecimento e o humedecimento do ar ocorrem principalmente na cavidade nasal e na faringe, mas continuam nas vias aéreas mais profundas, pelo que o ar que atinge os alvéolos está à temperatura corporal e completamente saturado com água (Beck-Broichsitter *et al.*, 2011). A filtração do ar inspirado é um mecanismo de defesa para evitar que as partículas de aerossol penetrem no pulmão profundo e está relacionada com as dimensões dos materiais particulados. Ocorre parcialmente no nariz, onde as partículas são capturadas por impacto (Beck-Broichsitter *et al.*, 2011). Outras substâncias inaladas depositam-se na camada de muco, segregado pelas células caliciformes e células glandulares da submucosa, formando um

filme semelhante a um gel, cujo principal componente é a mucina e reveste as paredes das vias aéreas condutoras (Evans e Koo, 2009).

As células ciliadas, alojadas principalmente no epitélio traqueal e bronquial da zona condutora são também importantes e a sua função principal é a propulsão ascendente do muco em direção à orofaringe, para eliminar as substâncias estranhas do pulmão, constituindo o transporte mucociliar (Lansley, 1993; Evans e Koo, 2009). Nos bronquíolos respiratórios o epitélio é constituído por células ciliadas e células Clara. As células Clara produzem o surfactante dos bronquíolos e inativam xenobióticos, por reações de oxidação dependentes do citocromo P450 (Hukkanen *et al.*, 2002).

Na região alveolar não está presente a camada de muco, mas antes um revestimento surfactante que cobre o epitélio e reduz a tensão superficial, evitando o colapso dos alvéolos durante a respiração (Creuwels *et al.*, 1997). O surfactante pulmonar contém cerca de 90% de lípidos, principalmente fosfolípidos (na maioria fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG)), uma pequena porção de lípidos neutros (Veldhuizen *et al.*, 1998) e 10% de proteínas (Goerke, 1998). As proteínas do surfactante (SP) são as SP-A e SP-D, com carácter hidrofílico e elevada massa molecular e as SP-B e SP-C que são hidrofóbicas de baixa massa molecular (Pérez-Gil e Keough, 1998). O surfactante é produzido pelos pneumócitos do tipo II que cobrem apenas 5% da superfície alveolar, mas são também importantes na coagulação e fibrinólise e na diferenciação em pneumócitos do tipo I (Fehrenbach, 2001; Shah *et al.*, 2012). Os pneumócitos do tipo I são células muito finas que revestem cerca de 95% da superfície do epitélio alveolar (Ehrhardt *et al.*, 2008), formando a barreira de difusão entre o ar e o sangue que é altamente permeável à água, gases e a moléculas hidrofóbicas e pouco permeável a substâncias hidrofílicas de grande tamanho (péptidos e proteínas) ou a iões. As macromoléculas passam por esta barreira através de mecanismos de transporte ativo (Gumbleton, 2001). Além das células epiteliais, os alvéolos contêm os macrófagos que incorporam as partículas, podem digeri-las e migrar lentamente com a carga para fora do trato respiratório pelo sistema mucociliar ou menos frequentemente, pelo sistema linfático (Beck-Broichsitter *et al.*, 2011).

## **2.1.2 ADMINISTRAÇÃO PULMONAR**

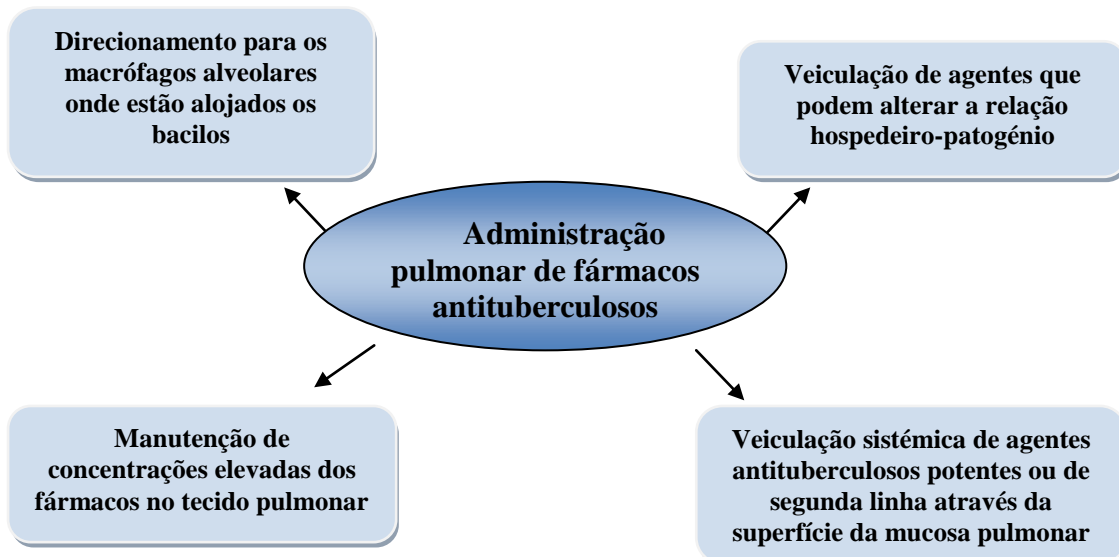
Nas últimas décadas tem havido muito interesse em desenvolver formulações de libertação prolongada na forma de aerossol, para administração pulmonar, de modo a

obter-se um efeito local ou para absorção sistêmica (Fig.2.2) (Gaspar *et al.*, 2008a; Beck-Broichsitter *et al.*, 2011). Um aerossol consiste na suspensão de partículas sólidas ou líquidas num gás (Dolovich, 2000).

A estratégia de veicular os compostos ativos para os pulmões poderá representar a melhor via para tratar as doenças pulmonares, pois permite a administração direta para o local de ação, conseguindo-se uma concentração muito superior, um início mais rápido do efeito, com menores efeitos sistêmicos do que a terapia oral e parenteral, o que pode aumentar a adesão dos pacientes (Kurmi *et al.*, 2010).

Os granulomas, onde estão alojados um grande número de bacilos, são pouco vascularizados e estão delimitados por um tecido fibroso fino, pelo que estas micobactérias podem ser expostas a níveis sub-terapêuticos de um ou mais fármacos, quando administrados pela via convencional, o que pode levar à emergência de estirpes resistentes do *M. tuberculosis*. Deste modo, a via pulmonar poderá ser muito útil, ao permitir concentrações de fármaco superiores na vizinhança dessas lesões (Conte *et al.*, 2000; Muttill *et al.*, 2009).

Por outro lado, os pulmões podem também ser usados como uma porta de entrada para o organismo, possibilitando a administração sistêmica dos princípios ativos, através das superfícies das vias respiratórias (Patton e Byron, 2007). Esta é uma abordagem atrativa, devido à elevada área superficial da região alveolar (cerca de 140 m<sup>2</sup>), espessura fina da barreira epitelial, vascularização extensa, atividade proteolítica relativamente baixa no espaço alveolar e ausência do metabolismo de primeira passagem (Patton, 1996).



**Figura 2.2** – Objetivos da seleção da via pulmonar para a administração de fármacos antituberculosos (adaptado de Dube *et al.*, 2012).

A eficácia da terapia com aerossóis depende diretamente da deposição pulmonar dos fármacos que, por sua vez resulta de uma interação complexa entre vários fatores, relacionados com o tamanho das partículas produzidas com o dispositivo de inalação, modo de inalação ou padrão respiratório e com a anatomia do trato respiratório do indivíduo (Rubin, 2010). A característica mais importante de um produto desenvolvido para administração pulmonar é o diâmetro aerodinâmico, uma expressão que conjuga diâmetro geométrico e densidade, ambos fatores determinantes no perfil de deposição das partículas nas vias respiratórias. O diâmetro aerodinâmico pode expressar-se de várias formas, sendo a mais comum o diâmetro aerodinâmico determinado em função da massa média das partículas (MMAD), em que 50% das partículas têm diâmetro superior a esse valor e os outros 50% tem diâmetro inferior (Labiris e Dolovich, 2003). Para uma partícula esférica e uniforme, o MMAD é definido pelo produto do seu diâmetro pela raiz quadrada da sua densidade (Rubin, 2010). Quanto menor o diâmetro, maior a probabilidade das partículas se depositarem nas partes profundas dos pulmões, ou seja, nos alvéolos. No geral, as partículas respiráveis são as que apresentam um MMAD entre 0.5-5.0  $\mu\text{m}$ . As partículas inferiores a 0.5  $\mu\text{m}$  são habitualmente eliminadas com a expiração e as superiores a 5.0  $\mu\text{m}$  podem impactar na orofaringe, principalmente quando a inalação ocorre rapidamente (Lipworth, 2000; Rau *et al.*, 2005), conduzindo à sua deglutição, com perda de fármaco e/ou maiores efeitos adversos sistêmicos (Rubin, 2010).

Outro fator importante é a distribuição do tamanho das partículas ou desvio padrão geométrico (GSD). Quanto mais uniforme for a população de partículas, menor será o valor do desvio. Por definição, um GSD menor que 1,22 indica um aerossol monodisperso, isto é, partículas com tamanho homogêneo, mas a maioria dos dispositivos produz aerossóis terapêuticos polidispersos (Dolovich, 2000; Rubin, 2010).

Embora em teoria a administração pulmonar possa realizar-se utilizando a cavidade nasal ou a oral, é a inalação oral que se usa frequentemente. Por outro lado, em investigação utiliza-se muito a instilação intratraqueal, em que uma pequena quantidade de solução ou dispersão do fármaco é transportada diretamente para os pulmões, com um equipamento especial (Patil e Sarasija, 2012). É um método rápido, simples, barato e permite quantificar o fármaco transportado para os pulmões, mas a sua distribuição não é uniforme. Contudo, não é uma via fisiológica e os animais estão sob o efeito de anestesia, logo os resultados podem não ser representativos do processo de inalação

natural em humanos (Patil e Sarasija, 2012). A inalação permite uma distribuição mais uniforme dos agentes terapêuticos, mas é um método mais caro e é difícil de medir a dose exata transportada para os pulmões (Fernandes e Vanbever, 2009).

Vários dispositivos para inalação estão disponíveis no mercado, como os inaladores pressurizados com válvula doseadora (MDIs), os inaladores de pó seco (DPIs) e os nebulizadores (Yang *et al.*, 2008). O dispositivo selecionado deve ser capaz de gerar e veicular as partículas/gotículas de diâmetro aerodinâmico específico e a seleção depende da natureza do fármaco e da formulação, do local de ação e da patofisiologia do pulmão (Patil e Sarasija, 2012).

Os MDIs usam um gás propulsor para atomizar a solução ou suspensão do fármaco e uma válvula doseadora para regular a saída da quantidade definida de aerossol e requerem uma inspiração coordenada (Fink, 2000; Berger, 2009). Muitos pacientes têm dificuldades em coordenar a ativação do aparelho com a inspiração, o que pode fazer variar a quantidade e o local de deposição do composto nas vias aéreas, além de contribuir para efeitos sistêmicos adversos (Oliveira *et al.*, 2005). Os DPIs produzem um aerossol mais estável, não necessitam de gases propulsores e operam através do fluxo de inspiração do paciente para desintegração do pó e obtenção da dose. Assim, a reprodutibilidade da dose inalada a partir destes dispositivos é extremamente dependente do paciente. Exigem força muscular inspiratória e função pulmonar adequadas, limitando o uso em crianças muito jovens, idosos e pacientes com doença pulmonar grave (Onoue *et al.*, 2009).

Nos nebulizadores o fármaco é inicialmente solubilizado/suspense num meio aquoso e depois aerossolizado (Pandey e Khuller, 2005a). Não são usados gases propulsores e não necessitam de respiração coordenada ou de um grande esforço inspiratório. Os mais comuns são os nebulizadores a jato, que utilizam ar comprimido ou oxigênio para produzir o aerossol e os nebulizadores ultrassônicos em que a aerossolização é obtida através da vibração de um cristal piezoelétrico (O'Riorden, 2002; Knoch e Keller, 2005).

A terapia de inalação com novos sistemas terapêuticos, parece promissora para o combate à TB. Vários trabalhos atestam a sua aplicabilidade como os lipossomas (Deol *et al.*, 1997; Chimote e Banerjee, 2010), micropartículas (Hirota *et al.*, 2007; Muttill *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2007) e nanopartículas poliméricas (Pandey *et al.*, 2003). Contudo, conseguir a libertação prolongada do fármaco pode ser algo problemático, pois o sistema respiratório tende a expelir os materiais introduzidos pela via aérea, o que

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

dificulta a sua permanência no pulmão profundo, o tempo suficiente para ser eficaz (Yang *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011).

Apesar dos vários trabalhos publicados acerca de terapias inaladas para a TB com os fármacos de primeira e segunda linha, ainda nenhuma formulação está disponível na clínica. Uma das razões pode ser a complexidade em produzir fármacos em formulações respiráveis, usando excipientes seguros e aprovados e a dificuldade em desenvolver processos para produção em larga escala.

## **2.2 MÉTODOS *IN VITRO* PARA A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS SISTEMAS TERAPÊUTICOS**

A eficácia *in vitro* dos sistemas de veiculação dos fármacos é estudada em vários modelos de culturas celulares, por infecção com estirpes virulentas do *M. tuberculosis* (Muttill *et al.*, 2009). Têm sido usados macrófagos humanos, de ratinhos, ratos, coelhos e também de cobaias. Os macrófagos podem ser linhas celulares imortalizadas ou MAs primários recolhidos das várias espécies (Muttill *et al.*, 2009). Os MAs primários humanos, obtidos por lavagem bronco alveolar (BAL) são os mais importantes para os estudos *in vitro*. Outras fontes incluem os macrófagos derivados dos monócitos e as células semelhantes aos macrófagos da linha celular THP-1 (linha celular da leucemia humana aguda monocítica) (Riendeau e Kornfeld, 2003). As linhas celulares imortais, constituem uma população homogênea, não é necessário o sacrifício animal e, por estarem sujeitas a controlo experimental, permitem a reprodutibilidade nos resultados. Por outro lado, as células primárias humanas obtidas por BAL refletem melhor os acontecimentos *in vivo*, apesar de poder haver variabilidade por serem uma população heterogênea (Muttill *et al.*, 2009).

Várias estirpes de *Mycobacterium* são usadas para infetar experimentalmente as células, como o *M. bovis* e o complexo *Mycobacterium avium* (MAC), um grupo de micobactérias ambientais relacionadas que inclui as subespécies *avium*, *paratuberculosis* e *M. intracellulare*. O MAC é menos suscetível à maioria dos fármacos antituberculosos do que as outras espécies, o que pode ser consequência de uma diminuição da permeabilidade do organismo a estes agentes terapêuticos (Young, 1994). São ainda usadas algumas estirpes do *M. tuberculosis* que se tornaram adaptadas para o crescimento em laboratório e são pouco representativas do atual contexto clínico

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

e incluem a H37Ra (estirpe não patogénica), H37Rv, Erdman e Beijing e mais recentemente, a estirpe clínica CDC1551 (Fux *et al.*, 2005).

## **2.3 MÉTODOS *IN VIVO* PARA A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS SISTEMAS TERAPÊUTICOS**

Vários modelos animais, nomeadamente, ratinhos, ratos, cobaias, coelhos e primatas não humanos, têm contribuído substancialmente para a compreensão da TB, incluindo a patogénese e os processos imunológicos da doença, bem como a avaliação de fármacos e vacinas (McMurray *et al.*, 1996).

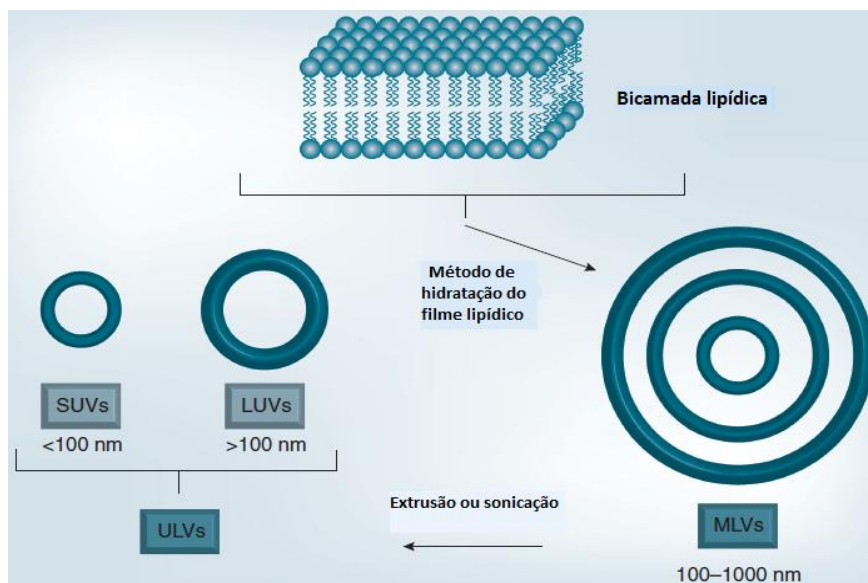
Os modelos de animais de grande porte, como os primatas, são considerados mais relevantes para o estudo da doença, pois mimetizam melhor a TB que ocorre nos humanos. Contudo, não são muito usados por motivos económicos, questões éticas e disponibilidade limitada (Muttill *et al.*, 2009). Os ratinhos são o modelo animal mais estudado, contribuindo muito significativamente para o que se conhece atualmente acerca da TB. A fisiopatologia apresenta semelhanças com a doença nos humanos, embora existam diferenças, nomeadamente no granuloma que se forma em resposta à infeção. Os pulmões dos humanos contêm vários tipos de granuloma (necróticos, caseosos, cavitários), com um número variável de bactérias, o que não acontece nos ratinhos, pois a caseação, necrose e liquefação características da TB humana parecem não ocorrer em ratinhos, tal como em cobaias (Muttill *et al.*, 2009). Além disso, os ratinhos são mais resistentes à infeção pelo *M. tuberculosis*, pelo que há necessidade de inóculos maiores. Por outro lado, os coelhos exibem cavidades e caseação (Misra *et al.*, 2011).

## **3. NOVOS SISTEMAS TERAPÊUTICOS COM APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

### **3.1 LIPOSSOMAS**

Os lipossomas são estruturas vesiculares, constituídas por uma ou múltiplas bicamadas de fosfolípidos (moléculas anfotéricas) orientadas concêntricamente em torno de um compartimento aquoso, onde os grupos polares hidrofílicos estão em

contacto com o meio aquoso e os grupos apolares hidrofóbicos formam o centro da bicamada (Owen *et al.*, 2005). A maioria dos lipossomas incorpora também colesterol, para conferir rigidez e estabilidade à formulação (Zhang e Granick, 2006). Os sistemas caracterizam-se geralmente quanto ao tamanho e número de bicamadas (Fig.3.1). No caso de conterem múltiplas bicamadas, designam-se por vesículas multilamelares (MLVs), enquanto as vesículas unilamelares (ULVs) têm apenas uma. Por sua vez, as ULVs, dependendo do tamanho, são classificadas como pequenas (SUVs) com um diâmetro inferior a 100 nm e grandes (LUVs), as que têm um diâmetro superior a 100 nm (Dean *et al.*, 2007).



**Figura 3.1** - Lipossomas com diferentes tamanhos e número de lamelas. ULV - Vesícula unilamelar, SUV - Vesícula unilamelar pequena, LUV - Vesícula unilamelar grande, MLV - Vesícula multilamelar (adaptado de Pinheiro *et al.*, 2011).

Os fosfolípidos podem ser de natureza sintética ou natural e os mais usados são a PC, a fosfatidilserina (PS), o PG e a esfingomiéline (SM). Entre estes, a PC, derivada das lecitinas do ovo ou da soja, é a mais utilizada, apresentando elevada estabilidade face a variações do pH ou da concentração salina do meio (Fang *et al.*, 2006). Os fosfolípidos são caracterizados por uma temperatura de transição de fase ( $T_c$ ), na qual a membrana passa de uma fase gel, em que a cadeia hidrocarbonada do lípido está em estado ordenado, para uma fase de cristal-líquido, onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e os radicais hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados. A permeabilidade dos lipossomas é relativamente baixa quando a temperatura é inferior à  $T_c$  (Frézard, 1999).

Os métodos de preparação dos lipossomas incluem a hidratação de um filme lipídico seco acima da T<sub>c</sub>, seguido da sonicação ou extrusão para reduzir o tamanho das vesículas (Balen *et al.*, 2004).

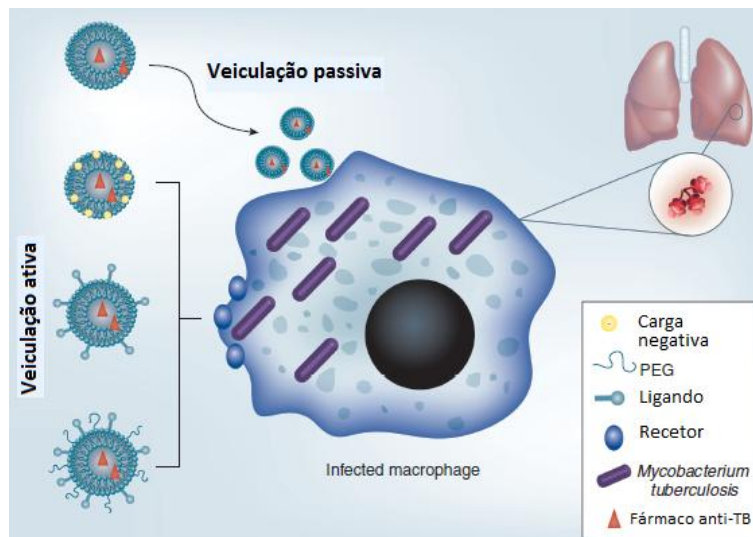
Os lipossomas têm sido muito estudados como sistemas de veiculação de fármacos e parecem ter elevado potencial no tratamento da TB. A sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, carga superficial, fluidez, composição e a presença de ligandos alteram significativamente a sua especificidade para os MAs (Justo e Moraes, 2003; Santos e Castanho, 2002). Estes sistemas podem encapsular moléculas hidrofílicas e/ou lipofílicas, alojando-se as primeiras no compartimento aquoso, enquanto as lipofílicas são inseridas ou adsorvidas na bicamada (Mufamadi *et al.*, 2011). Devido à sua estrutura em bicamada, a qual mimetiza as membranas celulares, os lipossomas têm capacidade para se fundirem rapidamente com os organismos infecciosos e libertarem os fármacos para as membranas celulares ou no meio intracelular (Zhang *et al.*, 2010). Além disso, de uma forma geral são produzidos com materiais que lhes garantem biodegradabilidade, biocompatibilidade, ausência de imunogenicidade e baixa toxicidade (Edwards e Baeumner, 2006). Possuem elevada capacidade de carga de fármaco, podem ser administrados por várias vias i.v., i.m., s.c., i.p., oral, ocular, nasal, pulmonar e dérmica), podem minimizar a toxicidade sistémica dos fármacos, aumentar a sua estabilidade e melhorar substancialmente a farmacocinética e a biodistribuição (Kawakami *et al.*, 2000; Hattori *et al.*, 2006; Gaspar *et al.*, 2008a). A sua estabilidade biológica depende da presença de agentes presentes nos fluídos biológicos que interagem com eles, estando, portanto, relacionada com a via de administração (Lasic, 1998). São altamente vulneráveis às lipases intestinais, por isso devem ser veiculados por outras vias diferentes da oral, no tratamento da TB pulmonar (Pandey e Khuller, 2006).

Quando administrados via i.v., os lipossomas convencionais (fosfolípidos com ou sem colesterol) interagem com dois grupos de proteínas do sangue, as lipoproteínas, principalmente as de alta densidade (HDL) e as opsoninas (Machado *et al.*, 2007). As lipoproteínas podem remover os fosfolípidos, abrindo poros, através dos quais o conteúdo dos lipossomas é libertado antes de atingir o alvo (Kirby e Gregoriadis, 1981). Essas interações são diminuídas ou inibidas se pelo menos 30% do total dos lípidos for constituído por colesterol, diminuindo o extravasamento do composto encapsulado (Sharma e Sharma, 1997; Machado *et al.*, 2007). Por outro lado, os lipossomas são rapidamente removidos da corrente sanguínea, devido à adsorção das opsoninas, o que

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

desencadeia o reconhecimento e a sua captura pelo SFM, especialmente pelos macrófagos do fígado (células de Kupffer) e do baço (Ahsan *et al.*, 2002; Sapa e Allen, 2003). Assim, as formulações lipossomais são muito promissoras no tratamento de infecções intracelulares (Couvreur *et al.*, 1991; Fielding e Lasic, 1999). Esta biodistribuição diferencial justifica o maior efeito terapêutico, observado no fígado e baço quando os fármacos são incorporados nos lipossomas convencionais, em comparação com os efeitos obtidos no pulmão em modelos de infecção do *M. tuberculosis* (Vladimirsky e Ladigina, 1982; Adams *et al.*, 1999) daí ser uma abordagem a considerar para a TB extrapulmonar (Gaspar *et al.*, 2008a). Mas, a administração i.v. também pode ser avaliada para a TB pulmonar, se forem adicionados ligandos específicos aos lipossomas (Deol e Khuller, 1997).

Para superar algumas das falhas dos lipossomas convencionais (veiculação passiva), relativas ao reduzido tempo de circulação e à fraca especificidade, foi desenvolvida a veiculação ativa (específica) (Fig.3.2) dos agentes terapêuticos que envolve o uso de formulações lipossomais contendo lípidos com carga, polímeros hidrofílicos ou a anexação de um ligando que podem ser proteínas, péptidos, polissacáridos, glicolípidos, glicoproteínas e anticorpos monoclonais, para uma acumulação preferencial dos fármacos nos locais alvo, reduzindo assim a sua toxicidade (Surendiran *et al.*, 2009).

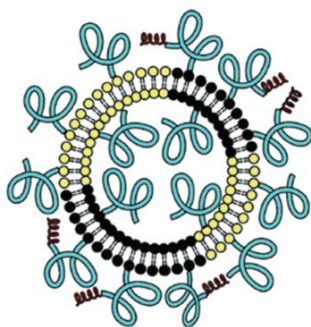


**Figura 3.2** – Uso de lipossomas como sistemas transportadores de fármacos para os macrófagos alveolares. PEG – Poli(etilenoglicol) (adaptado de Pinheiro *et al.*, 2011).

A modificação da superfície lipossomal com lípidos de carga negativa (aniônicos), como o dicetilfosfato (DCP), parece aumentar a afinidade para os MAS através dos receptores *scavenger* (Vyas *et al.*, 2004). Por outro lado, a carga produz

repulsão eletrostática entre as vesículas, ajudando a diminuir a sua instabilidade devido à agregação e fusão das vesículas e o extravasamento do fármaco (Yarosh, 2001).

Os lipossomas também podem ser alterados para terem um tempo de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) maior, pela modificação da superfície com polímeros hidrofílicos naturais, como o monossialogangliósido e o fosfatidilinositol (PI), ou sintéticos, principalmente o poli(etilenoglicol) (PEG) (Fig.3.3) (Sagristá *et al.*, 2000; Torchilin, 2005). O revestimento dos lipossomas com PEG, constitui os designados lipossomas *Stealth*<sup>®</sup> (Machado *et al.*, 2007; Li e Huang, 2010) que prolongam o seu tempo em circulação na corrente sanguínea, pela formação da camada hidrofílica, a qual reduz a ligação de opsoninas, retardando o reconhecimento e captura pelas células do SFM (Atyabi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Apesar da obtenção de resultados importantes, continua a haver pouca especificidade do transporte dos compostos ativos para as células alvo (Torchilin, 2005).



**Figura 3.3** - Esquema de um lipossoma *Stealth*<sup>®</sup> (Mufamadi *et al.*, 2011).

Uma terceira abordagem consiste na conjugação de ligandos com afinidade para determinados recetores das células alvo, com a superfície lipossomal, para um direcionamento específico do fármaco (Sapra e Allen, 2003; Machado *et al.*, 2007). Vários ligandos têm sido investigados para o tratamento da TB, como a albumina de soro bovino maleilada (MBSA), a *O*-estearoil amilopectina (*O*-SAP), moléculas com terminais manose e a tuftsina. A MBSA apresenta afinidade específica para os recetores do tipo *scavenger* dos macrófagos, pois é um ligando aniónico, enquanto o *O*-SAP tem maior afinidade para os MAs (Vyas *et al.*, 2004; Vyas e Khatri., 2007). Os MAs expressam níveis elevados do recetor de manose, uma proteína transmembranar de 175 kDa da família das lectinas do tipo C (McGreal *et al.*, 2004), cujos ligandos possuem um glúcido terminal como a manose, *N*-acetilglucosamina e a fucose, sendo encontrados em diferentes microrganismos (vírus, bactérias, leveduras e fungos) (Stahl *et al.*, 1978). Estes recetores estão envolvidos na mediação da fagocitose, na ativação do

complemento e também no equilíbrio homeostático e inflamação (Turner, 1996; Irache *et al.*, 2008), podendo assim, identificar e capturar os agentes patogênicos como o *M. tuberculosis*. A manipulação dos lipossomas é assim uma abordagem atrativa para o transporte seletivo para os MAs (Bhardwaj *et al.*, 2011) e pode ser conseguida pelo uso de ligandos, como o colesten-5-iloxi-*N*-(4-((1-imino-2- $\alpha$ -tioglicosiletil)amino)butil)formamida (Man-C4-Col) (Nakamura *et al.*, 2009).

O tetrapéptido tuftsina (treonina-lisina-prolina-arginina) (Thr-Lis-Pro-Arg) deriva do processamento proteolítico da imunoglobulina G (IgG) (resíduos 289–292) e é usado como um estimulante natural da fagocitose (Nishioka *et al.*, 1973). Liga-se especificamente aos macrófagos, monócitos e leucócitos polimorfonucleares e potencia a sua atividade fagocitária (Agrawal e Gupta, 2000).

O uso de lipossomas para administração pulmonar de fármacos no tratamento da TB também tem sido avaliado (Gilbert, 1996; Vyas *et al.*, 2005), apresentando como grande vantagem a elevada biocompatibilidade dos fosfolípidos, porque são constituintes do surfactante pulmonar (Malam *et al.*, 2009). O tratamento mediado por lipossomas pode ser uma abordagem muito promissora como alternativa ao regime atual, para obter uma terapia com boa adesão, baixo custo, menor frequência de administração, efeitos tóxicos reduzidos e para diminuir o tempo da terapia (Pinheiro *et al.*, 2011).

### **3.1.1 VEICULAÇÃO PASSIVA**

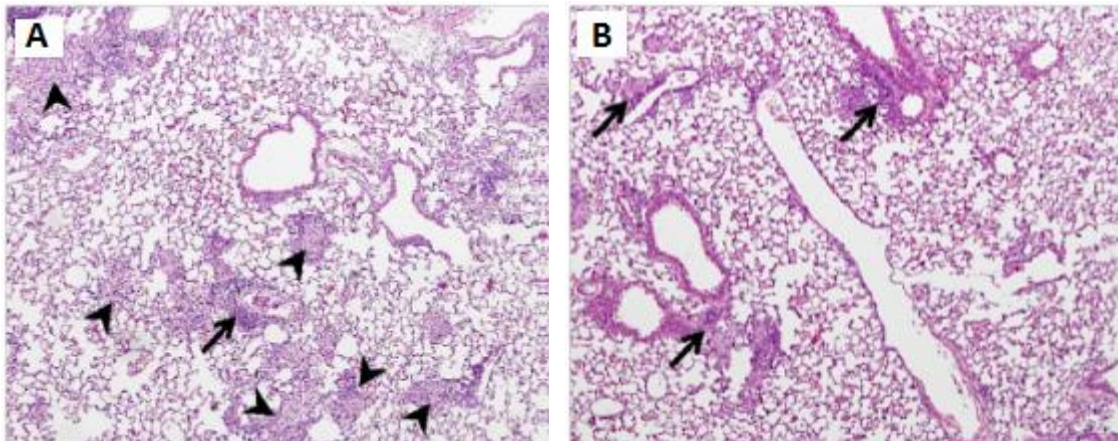
#### **3.1.1.1 VIA PARENTERAL**

A via parenteral tem sido a mais usada para a administração de fármacos encapsulados em lipossomas pela estratégia da veiculação passiva.

Ao administrar a INH e a RIF em formulações convencionais atingem-se concentrações baixas no soro e os agentes são mantidos em circulação, durante menos de 24 h (Labana *et al.*, 2002). A associação da INH e da RIF em lipossomas tem sido testada por vários investigadores. O tratamento durante 30 dias, de ratinhos infetados pelo *M. tuberculosis* com lipossomas compostos por PC do ovo, colesterol e cardiolipina (proporção molar de 7:2:1) para a co-encapsulação dos dois fármacos, resultou numa sobrevivência superior (~85%), na diminuição das unidades formadoras

de colónias (CFU) e menor inflamação pulmonar, relativamente aos agentes não encapsulados (Orozco *et al.*, 1986).

Gaspar e os seus colaboradores (2008b) desenvolveram várias formulações de rifabutina (RFB) e compararam o seu perfil *in vivo* com a RFB livre, após administração i.v. e obtiveram concentrações superiores do antibiótico no fígado, baço e pulmões após 24 h. A concentração da RFB nestes órgãos dependeu da rigidez dos lípidos usados. A formulação preparada com dipalmitoilfosfatidilcolina:dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPC:DPPG) foi mais eficaz e foi selecionada para a avaliação biológica num modelo de ratinho de TB disseminada. Os animais tratados com a formulação (a cada 3 dias, durante 2 semanas) apresentaram uma carga bacteriana menor no baço e fígado, relativamente à RFB livre. No pulmão, apesar de não se terem verificado diferenças na carga bacteriana, o nível da patologia foi menor nos ratinhos tratados com a RFB encapsulada (Fig.3.4). Esta abordagem parece ser promissora para o tratamento da TB extrapulmonar, particularmente em pacientes co-infetados pelo VIH, pois a combinação da terapia antirretroviral com a RIF origina uma concentração sub-terapêutica dos fármacos antirretrovirais. Como a RFB produz menor indução do citocromo P450-3A do que a RIF, poderá minimizar a interação farmacológica (Gaspar *et al.*, 2008b; Figueiredo *et al.*, 2009).

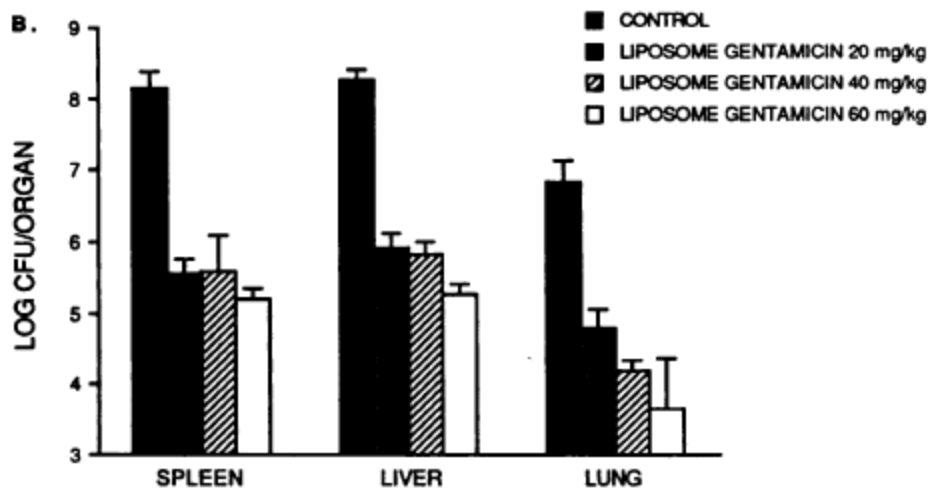


**Figura 3.4** - Histopatologia do pulmão de ratinhos infetados pelo *M. tuberculosis* tratados com rifabutina (RFB) livre e encapsulada. Observação ao microscópio ótico (ampliação 40X) com os corantes hematoxilina e eosina. (A) Animais tratados com RFB livre e (B) RFB encapsulada.

A distribuição dos granulomas foi diferente nos dois grupos. Em A os granulomas estavam predominantemente dispersos no parênquima (setas) e em B ficaram restritos à área perivascular (seta) (Gaspar *et al.*, 2008b).

A formulação de AMK, MiKasome<sup>®</sup> (suspensão de SUV injetável) prolongou o  $t_{1/2}$  do fármaco no plasma de 12,6 min para 24,5 h em ratos e aumentou o tempo de residência médio em todos os tecidos (pulmões 62.9 h, fígado 95 h, baço 134 h e rim 228 h) (Fielding *et al.*, 1998). As propriedades farmacocinéticas modificadas incrementaram a atividade contra a TB em ratinhos, quando a formulação foi administrada via i.v. (3 dias/semana, durante 4 semanas). Os autores estimaram que a MIKasome<sup>®</sup> foi 2.4–5 vezes mais potente contra o *M. tuberculosis* e o  $t_{1/2}$  foi superior em relação à solução do fármaco (Dhillon *et al.*, 2001). Os ensaios em humanos com estádios avançados de TB não foram tão motivantes, pois apesar da concentração plasmática total elevada da AMK, não houve evidência de atividade bactericida. Isto provavelmente deveu-se à libertação do agente nos macrófagos, em locais demasiado longe dos grandes aglomerados extracelulares de bacilos da cavidade caseosa (Donald *et al.*, 2001).

A gentamicina (GEN) encapsulada foi avaliada num modelo de ratinho infetado com *M. avium*, ocorrendo uma redução significativa da contagem bacteriana no baço e fígado que dependeu da dose, em relação ao fármaco livre, mas não foi detetada a esterilização (Fig.3.5) (Klemens *et al.*, 1990).



**Figura 3.5** - Variação da atividade da gentamicina encapsulada em lipossomas com a concentração, administrada duas vezes por semana a ratinhos (Klemens *et al.*, 1990).

A encapsulação da ofloxacina (OFLX) e da claritromicina (CLR) em lipossomas aumentou significativamente, a internalização e a eficácia intracelular dos fármacos contra o complexo *Mycobacterium avium* (MAC) em macrófagos humanos derivados do sangue, em concentrações equivalentes dos agentes livres (Onyeji *et al.*, 1994a). Também a azitromicina (AZT), RFB e CLR encapsuladas aumentaram de modo

significativo, o transporte destes fármacos para os macrófagos humanos e a sua atividade antimicobacteriana, num ensaio *in vitro* (Onyeji *et al.*, 1994b). Nesses dois estudos, a adição de EMB aos fármacos livres e aos formulados levou a um incremento da sua atividade (Onyeji *et al.*, 1994a; Onyeji *et al.*, 1994b). Os lipossomas preparados com AZT ou ciprofloxacina (CFLX) testados *in vitro* apresentaram uma atividade antimicobacteriana 40 vezes superior em macrófagos de ratinhos com o *M. avium*, comparativamente às soluções dos compostos ativos. A acumulação celular e atividade antimicrobiana máximas da CFLX verificou-se com o aumento da carga negativa dos lipossomas (Oh *et al.*, 1995).

Ao usar a CPM em solução ou encapsulada em MLVs de DPPC, administrada por i.v. (60 ou 120 mg/kg), diariamente por 5 dias, em ratinhos com *M. avium* disseminado, verificou-se que a dose de 120 mg/kg aumentou a acumulação da CPM no baço, pulmões e rins e o  $t_{1/2}$  no soro e reduziu significativamente o número de micobactérias viáveis no fígado, baço, pulmões e sangue em relação aos controlos (Tabela 3.1) (Le Conte *et al.*, 1994).

**Tabela 3.1** - Atividade *in vivo* das formas livre ou lipossomal da capreomicina em ratinhos, após um tratamento de cinco dias (Le Conte *et al.*, 1994).

Treatment	$\log_{10}$ CFU/g (or CFU/ml) of tissue (or blood) (mean $\pm$ SD)			
	Liver	Spleen	Lung	Blood
Control ( $n = 5$ )	$6.8 \pm 0.3$	$6.9 \pm 0.3$	$4.8 \pm 0.3$	ND <sup>a</sup>
Free capreomycin at 60 mg/kg ( $n = 7$ )	$6.3 \pm 0.3^b$	$6.5 \pm 0.3$	$4.5 \pm 0.3$	ND
Liposomal capreomycin at 60 mg/kg ( $n = 7$ )	$6.3 \pm 0.2^b$	$6.4 \pm 0.3^b$	$4.6 \pm 0.4$	ND
Control ( $n = 6$ )	$7.2 \pm 0.2$	$7.5 \pm 0.3$	$5.3 \pm 0.2$	$3.3 \pm 1$
Free capreomycin at 120 mg/kg ( $n = 8$ )	$7.0 \pm 0.1$	$7.3 \pm 0.1$	$5 \pm 0.4$	$2.1 \pm 1.3$
Liposomal capreomycin at 120 mg/kg ( $n = 6$ )	$6.6 \pm 0.2^{c,d}$	$6.6 \pm 0.2^{c,d}$	$4.6 \pm 0.4^c$	$2 \pm 0.5^b$

<sup>a</sup> ND, not done.

<sup>b</sup>  $P < 0.05$  versus control (Mann-Whitney test).

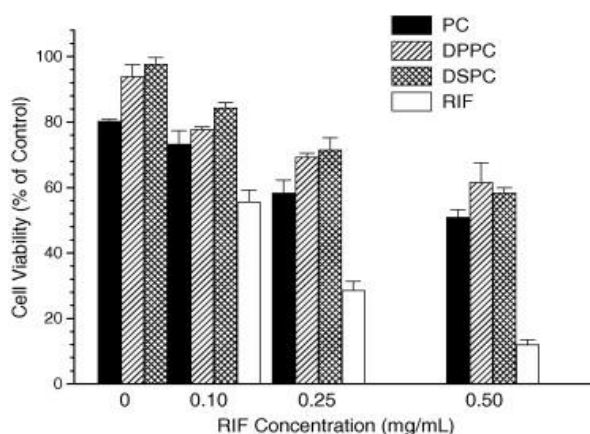
<sup>c</sup>  $P < 0.01$  versus control.

<sup>d</sup>  $P < 0.01$  versus free form.

### 3.1.1.2 VIA PULMONAR

Pandey e colaboradores (2004) formularam uma suspensão de MLVs para nebulização constituída por PC e colesterol (proporção molar 2:1.5) com INH e RIF. Cerca de 94% do aerossol gerado era respirável, com um MMAD de  $0.96 \pm 0.06 \mu\text{m}$ . Apenas uma única administração a cobaias, foi suficiente para manter as concentrações terapêuticas dos fármacos no plasma, durante 48 h, mas os agentes não encapsulados foram eliminados 24 h após a nebulização. Além de conseguirem veicular os agentes

para os pulmões, também permitiram que estes estivessem presentes nos MAs até 5 dias após a administração. Zaru e colaboradores (2007) desenvolveram várias MLVs formadas por PC, DPPC ou diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) com ou sem colesterol para o transporte da RIF. A formulação composta por DSPC/colesterol (2:1) apresentou a eficácia de encapsulação e a eficiência de nebulização mais elevadas. Nos testes de toxicidade e das propriedades mucoadesivas do sistema em linhas celulares A549 (representativas do epitélio alveolar) houve uma menor toxicidade em relação ao agente livre (Fig.3.6), mas as propriedades mucoadesivas foram reduzidas (comparado com as partículas de quitosano), o que constituiu uma falha da formulação, porque estas propriedades são de extrema importância para promover a retenção e abrandar a libertação do fármaco *in situ*.



**Figura 3.6** - Viabilidade das células alveolares A549 após incubação por 24 horas com várias concentrações de rifampicina livre ou incorporada em lipossomas (Zaru *et al.*, 2007).

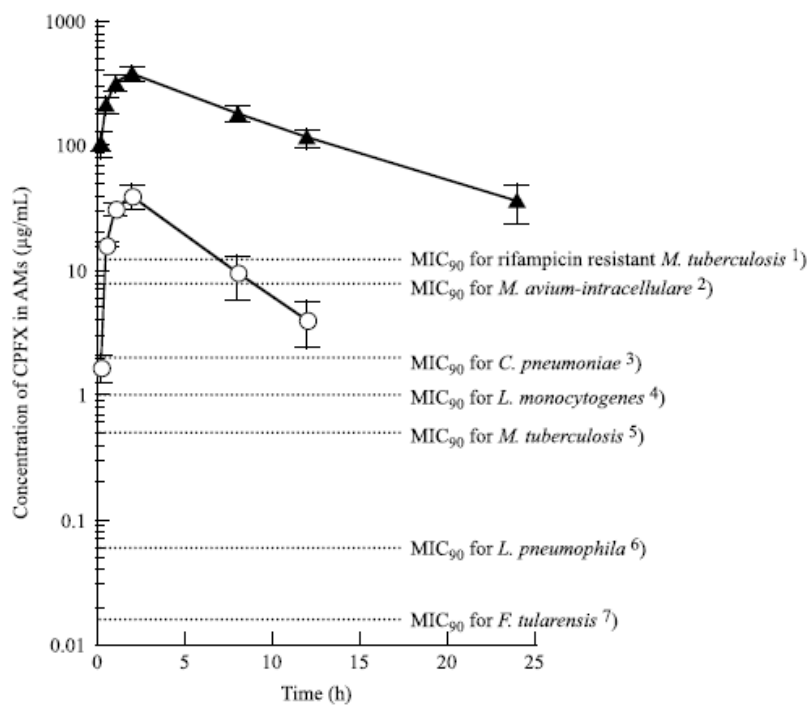
Recentemente, este grupo investigou a aplicação de lipossomas (SUV) revestidos com quitosano (polímero natural hidrossolúvel) também para veicular a RIF por nebulização. As propriedades mucoadesivas foram substancialmente melhores em comparação com os não revestidos e houve uma menor toxicidade do fármaco para as células epiteliais A549, relativamente à RIF livre (Zaru *et al.*, 2009).

A TB pulmonar provoca fibrose pulmonar e o colapso alveolar por disfunção do surfactante pulmonar. Os surfactantes exógenos, na forma de aerossóis podem atuar como agentes anti atelectáticos, estabilizando os alvéolos pulmonares doentes e permitindo que o fármaco os atinja uniformemente (Chimote e Banerjee, 2005; Chimote *et al.*, 2009). A DPPC, o principal fosfolípido do surfactante pulmonar foi usado para transportar a INH, RIF e EMB. Os lipossomas apresentaram uma boa deposição

alveolar e ocorreu a liberação prolongada *in vitro* dos compostos ao longo de 24 h. O sistema era biocompatível e as propriedades físico-químicas mantiveram-se estáveis, mesmo após o armazenamento, durante um mês a 4°C. O estudo sugere que os surfactantes exógenos podem permitir a abertura e estabilizar os alvéolos colapsados, fazendo com que os fármacos os atinjam eficazmente (Chimote e Banerjee, 2009).

Há relativamente pouco tempo, foram avaliadas a deposição no pulmão e a clearance da AMK em voluntários humanos, após a inalação de suspensões lipossomais e 24 e 48 h após a administração, ainda foi detetada uma radioatividade de 60.4% e 38.3%, respetivamente (Weers *et al.*, 2009).

Lipossomas preparados com PC de soja hidrogenada, colesterol e DCP (7:2:1) com um tamanho de 1000 nm para veicular a CFLX, mostraram uma eficiência superior no transporte do composto para os MAs de rato, após a administração pulmonar. As concentrações de CFLX nos MAs, 24 h após a administração, foram superiores à concentração mínima inibitória (CMI) de vários parasitas intracelulares, entre os quais o *M. tuberculosis* (Fig.3.7). No ensaio de citotoxicidade o sistema induziu um excelente efeito antibacteriano sem efeitos prejudiciais ao tecido pulmonar (Chono *et al.*, 2006).

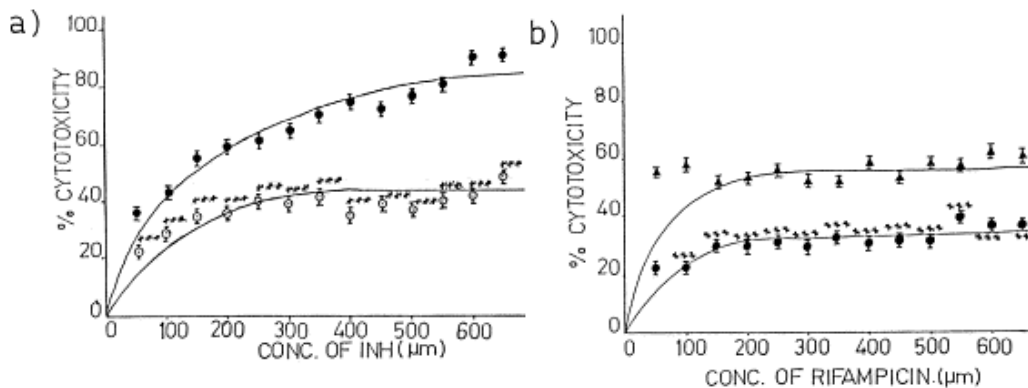


**Figura 3.7** - Comparação da concentração da ciprofloxacina nos macrófagos alveolares e a CMI<sub>90</sub> de vários parasitas intracelulares. (O) CPF livre, (▲) CPF encapsulada nos lipossomas de 1000 nm (Chono *et al.*, 2006).

### 3.1.2 VEICULAÇÃO ATIVA

#### 3.1.2.1 VIA PARENTERAL

Deol e Khuller (1997) usaram lipossomas (MLVs) Stealth<sup>®</sup> para o co-transporte direcionado para os pulmões da RIF e INH, compostos por PC, colesterol, DCP, *O*-SAP e monossilogangliósidos/diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (DSPE-PEG), administrados via i.v. (2 vezes/semana, por 6 semanas). Verificou-se uma maior acumulação nos pulmões do que no SFM, em ratinhos normais e infetados com TB. A administração prévia de lipossomas convencionais de PC e colesterol (2:1.5) antes da administração dos lipossomas Stealth<sup>®</sup> aumentou ainda mais a sua internalização pelos pulmões. Os estudos *in vivo* demonstraram a liberação lenta e controlada dos fármacos encapsulados. Além disso, os compostos foram menos tóxicos para os macrófagos peritoneais (*in vitro*) (Fig.3.8) e também *in vivo*, ocorrendo uma redução da hepatotoxicidade, relativamente aos não formulados.

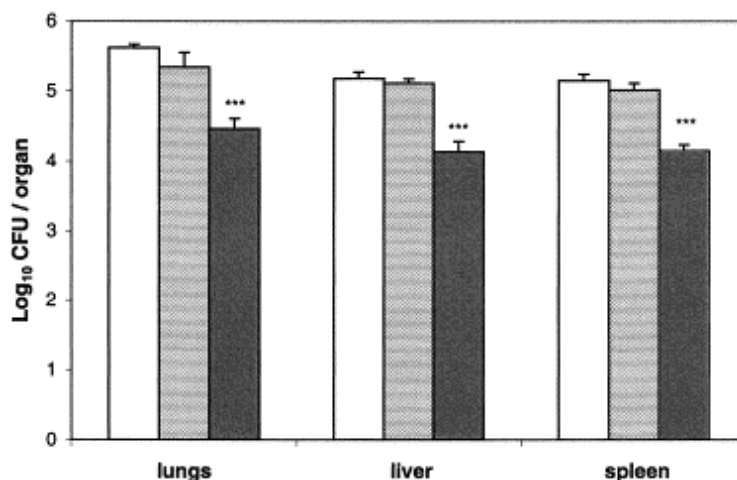


**Figura 3.8** - Percentagem de citotoxicidade das diferentes concentrações de isoniazida e rifampicina encapsuladas e livres, nos macrófagos peritoneais. (a) Citotoxicidade da isoniazida lipossomal (○) e livre (●). (b) Citotoxicidade da rifampicina (●) lipossomal e (▲) livre (Deol e Khuller, 1997).

A coadministração da INH e da RIF por via i.v. a ratinhos com 1/3 das doses recomendadas (INH 12 mg/kg e RIF 10 mg/kg) incorporadas em lipossomas Stealth<sup>®</sup> permitiu a liberação prolongada dos fármacos no plasma e nos órgãos (pulmão, fígado e baço), durante 5 e 7 dias, respetivamente. A injeção da formulação (1 vez/semana, por 6 semanas) reduziu significativamente a carga micobacteriana do *M. tuberculosis* nos pulmões, fígado e baço, comparativamente aos agentes em solução dados pela via oral (Fig.3.9). Não houve nenhum sinal de hepatotoxicidade induzida pelos lipossomas,

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

durante o tratamento. Esta formulação poderá permitir uma administração semanal, em vez da dose diária atual (Labana *et al.*, 2002).



**Figura 3.9** - Unidades formadoras de colônias em diferentes órgãos de ratinho após quimioterapia com INH+RIF nas formas livre (▨) e encapsulada (■). O símbolo (□) representa o controle. (\*\*\*)  $P < 0.001$  (Labana *et al.*, 2002).

Agarwal e colaboradores (1994) desenvolveram SUVs de PC para veicular com maior eficácia a RIF para o pulmão, pela inclusão na superfície dos lipossomas do ativador de macrófagos tuftsina. A administração 2 vezes/semana, durante 2 semanas, foi cerca de 2000 vezes mais eficaz do que a RIF livre na redução da contagem bacteriana, nos pulmões dos animais infetados. Contudo, o pré-tratamento com lipossomas conjugados com a tuftsina, mas sem o fármaco não tornou os animais resistentes à infecção pelo *Mycobacterium*, nem aumentou de modo significativo a atividade da RIF. Assim, apesar da formulação se ter mostrado eficaz no tratamento da TB, a administração imunoproliférica com o ativador de macrófagos não trouxe vantagem.

### 3.1.2.2 VIA PULMONAR

Lipossomas (MLVs) de PC e colesterol (7:3) revestidos com os ligandos específicos dos MAs O-SAP ou MBSA foram desenvolvidos para a encapsulação da RIF e administrados como aerossol em ratos. Ambos os lipossomas apresentaram uma acumulação preferencial nos MAs em relação aos lipossomas convencionais e aos fármacos livres e verificou-se uma concentração elevada do fármaco após 24 h. Subsequentemente, os MAs foram isolados e infetados com *Mycobacterium smegmatis* e a viabilidade dos bacilos diminuiu significativamente para 10.9% com MBSA e 7.1%

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

com o ligando *O*-SAP, por comparação com a viabilidade de 31.6% e 45.7% obtidas com os lipossomas convencionais e RIF livre, respetivamente (Vyas *et al.*, 2004).

Wijagkanalan *et al.* (2008) avaliaram a eficiência do direcionamento do lipossomas manosilados para os MAs, com uma cultura primária de MAs e *in vivo* por administração intratraqueal a ratos. A internalização *in vitro* dos lipossomas constituídos por DSPC, colesterol e colesten-5-iloxi-*N*-(4-((1-imino-2-D-tiomanosiletil)amino)alquil)formamida (manose-C4-colesterol) 7.5% e 5.0% foi consideravelmente superior do que aqueles que tinham manose-C4-colesterol 2.5% ou que não continham o fármaco e foi significativamente inibida por um excesso de manano, sugerindo endocitose mediada pelo recetor de manose. Relativamente ao ensaio *in vivo* a administração da formulação de concentração 7.5% e 5.0%, também permitiu um direcionamento seletivo e uma incorporação significativamente elevada.

Na encapsulação da CFLX em lipossomas manosilados com tamanho de partícula de ~1000 nm, a eficiência do direcionamento da CFLX para os MAs de rato, após a inalação dos lipossomas foi significativamente superior, do que a CFLX em lipossomas convencionais, com o mesmo tamanho de partícula. Além disso, a formulação apresentou efeitos antibacterianos para várias bactérias, enquanto os lipossomas não específicos foram ineficazes contra várias dessas bactérias (Chono *et al.*, 2008).

### 3.2 NIOSSOMAS

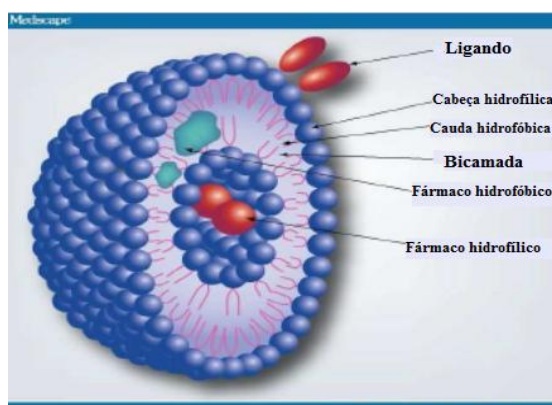
Os niossomas são vesículas unilamelares ou multilamelares, constituídas principalmente por surfactantes sintéticos não iónicos e, na maioria das vezes também por colesterol e indutores de carga (Namdeo e Jain, 1996). Os surfactantes apresentam diferente equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB). Quanto menor o HLB, mais lipofílico será o composto. Os mais usados, geralmente são os Spans<sup>®</sup>, os Tweens<sup>®</sup> e os Brijis<sup>®</sup> (Biswal *et al.*, 2008). O colesterol confere rigidez à bicamada para que as vesículas sejam menos permeáveis e também a forma apropriada à preparação niossomal (Yoshioka, 1994; Blazek-Walsh e Rhodes, 2001). Os indutores de carga na superfície ajudam na estabilização electrostática das vesículas. No geral, os niossomas carregados são mais estáveis contra a agregação e fusão, devido às forças repulsivas da mesma carga do que as vesículas não carregadas (Shilpa *et al.*, 2011). Os indutores de carga negativa mais usados são o DCP, dihexadecilfosfato, enquanto a estearilamina e o

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

cloreto de cetilpiridina induzem uma carga positiva (Bandyopadhyay e Johnson, 2007; Shan *et al.*, 2008).

Os niossomas caracterizam-se pelo tamanho, morfologia, carga, rigidez, homogeneidade e capacidade de carregar o fármaco. O tamanho dos niossomas pode variar entre 20 nm até cerca de 50  $\mu\text{m}$  (Shilpa *et al.*, 2011) e as vias de administração incluem a via oral, parenteral, tópica, ocular e outras (Madhav e Saini, 2011).

A estrutura em bicamada forma-se pela organização dos monómeros hidratados do surfactante (Shilpa *et al.*, 2011). Esta organização raramente é espontânea envolvendo habitualmente, algum aporte de energia (agitação mecânica ou aquecimento) (Lasic, 1990). Os grupos hidrofílicos do surfactante ficam em contato com o solvente aquoso e as partes hidrofóbicas são protegidas do mesmo (Fig.3.10). Podem transportar fármacos de diferentes solubilidades. Os compostos hidrofílicos são encapsulados no compartimento interno aquoso e os fármacos hidrofóbicos são transportados na membrana vesicular (Namdeo e Jain, 1996; Shilpa *et al.*, 2011).



**Figura 3.10** – Estrutura do niossoma (Chandu *et al.*, 2012).

A estrutura é semelhante aos lipossomas por se apresentarem em bicamada e podem ser úteis para colmatar os problemas associados à instabilidade química dos fosfolípidos dos lipossomas (Jain *et al.*, 2006). Os fosfolípidos têm propensão para a degradação oxidativa, apresentam custo elevado e pureza variável (El-Ridy *et al.*, 2011). O baixo custo dos constituintes dos niossomas e por não serem necessárias condições especiais para manusear e armazenar os surfactantes, a facilidade de produção em larga escala e a maior estabilidade das formulações tornam estes sistemas bastante interessantes como alternativa às outras tecnologias de encapsulação. Os niossomas são osmoticamente ativos, biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos (Madhav e Saini, 2011).

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

A encapsulação eficaz do agente bioativo nos niossomas evita a sua inativação protegendo-o do ambiente biológico, veicula o fármaco para o tecido alvo e proporciona a sua libertação prolongada na circulação sanguínea, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo a toxicidade (Jain e Vyas, 1995; Biju *et al.*, 2006; Chandu *et al.*, 2012). Contudo, os niossomas podem também apresentar alguns problemas relacionados com a instabilidade física, agregação, fusão, extravasamento do fármaco encapsulado e hidrólise dos fármacos encapsulados (Chandu *et al.*, 2012).

### **3.2.1 VEICULAÇÃO PASSIVA**

#### **3.2.1.1 VIA ORAL**

A RIF foi encapsulada em niossomas por Jain e Vyas (1995), com Span-85 e colesterol em várias frações molares com diâmetros entre 8-15  $\mu\text{m}$ . Após a administração oral em ratos, até 65% do fármaco foi localizado nos pulmões pelo ajuste do tamanho dos niossomas.

#### **3.2.1.2 VIA PARENTERAL**

Karki *et al.* (2008) encapsularam a INH em niossomas que libertaram o fármaco de modo prolongado *in vitro*, durante 48 h e mostraram uma menor toxicidade em ratos albinos, relativamente ao agente não encapsulado, ambos administrados por via i.v..

Noutro trabalho, formulações niossomais (1-2  $\mu\text{m}$ ) foram desenvolvidas para veicular a RIF com vários surfactantes não iónicos (Span-20, 40, 60, 80 e 85) e colesterol. A capacidade de encapsulação aumentou gradualmente com o aumento da hidrofobicidade do surfactante. Os niossomas que apresentaram *in vitro* a encapsulação máxima e velocidade de libertação mínima da RIF (niossomas obtidos com Span-85) (Tabela 3.2) foram selecionados para o estudo *in vivo* em ratos *Wistar*. Na administração por via i.p., a concentração da RIF foi substancialmente superior nos nódulos linfáticos torácicos (46.2% da dose administrada em comparação com 13.1% com o fármaco livre). Por outro lado, pela via i.v., apenas 7.3% do fármaco foi detetado na linfa torácica e 11.5% com o fármaco livre. Houve assim uma compartimentalização eficaz do fármaco no tecido linfático por administração via i.p. dos niossomas nos

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

animais. O sistema parece ser promissor para o tratamento da TB ao longo do sistema linfático, o segundo local com maior suscetibilidade para a doença (Jain *et al.* 2006).

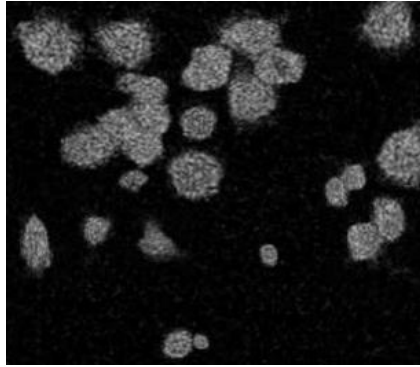
**Tabela 3.2** - Características da rifampicina encapsulada nos niossomas (Jain *et al.* 2006).

Composition of niosomes (Surfactant used)	Mean size of niosomes ( $\mu\text{m}$ )	% rifampicin entrapped	% rifampicin released in 120 h
Span - 20	1.8	20.6	80
Span - 40	1.8	25.3	73
Span - 60	1.7	28.5	68
Span - 80	1.8	31.7	60
Span - 85	1.9	35.4	52

A PZA, um agente fundamental para a terapia de curta duração, pois mata a população de bacilos semi-latentes que residem no ambiente ácido foi incorporada em niossomas de diferentes razões molares de Span 60 e 85 e colesterol [Span:colesterol (1:1) e (4:2)]. O DCP e a estearilamina induziram carga negativa e positiva, respetivamente. A percentagem mais elevada de PZA encapsulada foi obtida com o Span 60 e com os niossomas com carga negativa na razão molar (4:2:1), seguidos pelos niossomas constituídos por Span 60 neutros (4:2). A formulação transportou a concentração máxima de fármaco para o local afetado (pulmões) em cobaias infetadas com *M. tuberculosis* pela via s.c., evitou os efeitos adversos e diminuiu a toxicidade (El-Ridy *et al.*, 2011).

### 3.2.1.3 VIA NÃO ESPECIFICADA

Recentemente foi desenvolvida uma formulação niossomal para a INH (Fig.3.11), com Span 20 ou 60, colesterol para conferir rigidez à membrana dos niossomas e DCP como indutor da carga negativa. Nos estudos *in vitro* em macrófagos de ratinho J477A, os niossomas permaneceram no local tratado, durante um período de tempo prolongado e mantiveram concentrações estáveis do fármaco, durante 30 h. A incorporação da formulação pelos macrófagos foi elevada (61.8%). O sistema mostrou potencialidade para o tratamento da TB (Singh *et al.*, 2011).

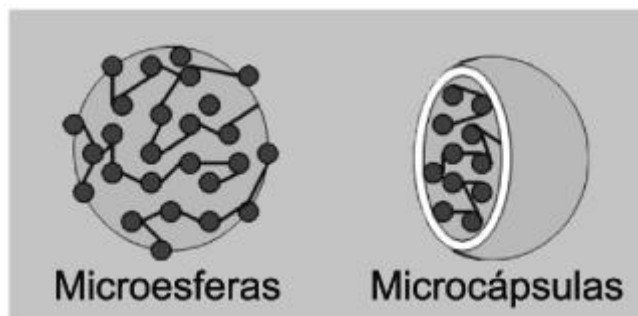


**Figura 3.11** - Niossomas contendo isoniazida acoplados ao corante calceína, após a internalização pelos macrófagos (Singh *et al.*, 2011).

Saritha *et al.* (2010) estudaram vesículas catiónicas para veicular a RIF. Encapsularam o composto solubilizado numa solução micelar, no compartimento aquoso dos niossomas. Os agentes de solubilização foram o plantacare (lauril glucósido) e Tween 80 (1:1) e a estearilamina conferiu a carga positiva. Os niossomas catiónicos obtidos eram multilamelares e apresentaram elevada eficiência de encapsulação sem extravasamento do fármaco, nem agregação. A RIF foi libertada de modo prolongado, durante 24 horas. Noutro trabalho, Pavala *et al.* (2010) incluíram a RIF e a gatifloxacina (GAT) em niossomas. As vesículas apresentaram um tamanho entre 100-300 nm e a eficiência de encapsulação foi de 73% para a RIF e 70% para a GAT. Cerca de 99% e 98% da RIF e GAT, respetivamente foram libertados da formulação, nos ensaios *in vitro*. As atividades bactericidas, avaliadas em estirpes do *M. tuberculosis* sensível (H37Rv) e resistente (RF 8554), pelo método radiométrico BACTEC mostraram uma elevada redução do índice de crescimento dos bacilos.

### 3.3 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As micropartículas (MPs) poliméricas são pequenas partículas sólidas e esféricas com tamanho variável entre 1-1000  $\mu\text{m}$  (Burgess e Hickey, 1994) e incluem as microcápsulas, sistemas reservatório que contêm a substância ativa revestida por polímeros de espessura variável, constituindo a membrana da cápsula, e as microsferas, sistemas matriciais nos quais o fármaco encontra-se uniformemente disperso e/ou dissolvido numa rede polimérica (Fig.3.12) (Kas e Oner, 2000). Uma grande variedade de fármacos, independentemente das suas massas moleculares e solubilidade em água, pode ser incorporada nas MPs biodegradáveis (Kiyoyama *et al.*, 2003).



**Figura 3.12** - Microesferas e microcápsulas poliméricas (Pimentel *et al.*, 2007).

Várias técnicas estão disponíveis para a microencapsulação dos princípios ativos como o método de emulsão/evaporação do solvente, secagem por aspersão, separação de fase/coacervação, deposição interfacial e polimerização *in situ*. A escolha depende das características do polímero e do fármaco, do local de ação e da duração da terapia (Jain, 2000).

Ao incorporar os fármacos no sistema, a estabilidade química e a atividade biológica dos princípios ativos devem ser mantidas, a eficiência de encapsulação deverá ser elevada o suficiente para a produção em massa, o tamanho das MPs tem de ser adequado à administração pelas diferentes vias e o perfil de liberação do fármaco deve ser reproduzível sem ocorrer a liberação inicial rápida (Severino *et al.*, 2011).

A biodegradabilidade dos polímeros é um atributo muito importante na liberação dos agentes terapêuticos, pois o material introduzido no organismo deve poder ser clivado em subprodutos biocompatíveis por hidrólise química ou enzimática e desaparecer depois de cumprida sua função (Severino *et al.*, 2011). Os produtos de degradação dos polímeros biodegradáveis formados são metabolizados em dióxido de carbono e água, pela via do ciclo de Krebs ou então são excretados na urina (Nair e Laurencin, 2007). A velocidade a que um polímero se degrada é fulcral para determinar a velocidade de liberação do agente terapêutico encapsulado e é consideravelmente influenciada pela massa molecular, polidispersão, cristalinidade, hidrofobicidade e estrutura química do polímero (Witschi e Doelker, 1998). Os polímeros com massas molares inferiores degradam-se mais rápido do que aqueles com massas molares maiores, tal como os ramificados, relativamente aos lineares (Lindhardt, 1998).

Outra propriedade importante é a bioadesão. Os polímeros bioadesivos ligam-se a substratos biológicos de duas maneiras distintas, aderindo à camada mucosa (mucoadesivos) ou à membrana celular (citoadesivos). A bioadesão permite aumentar o tempo de permanência de um fármaco no organismo, aumentando a sua BD, o que pode

reduzir o número de tomas. Além disso, a bioadesão pode ser modulada para ocorrer em sítios específicos, e assim, diminuir a toxicidade e incrementar a eficácia terapêutica (Asane *et al.* 2008). De um modo geral, as características que favorecem a bioadesividade são a massa molar elevada, a capacidade de dispersão em água, a presença de um grande número de grupos carboxilo e/ou hidroxilo, a capacidade para formar ligações de hidrogénio, a flexibilidade da cadeia polimérica e a superfície carregada negativamente, embora alguns polímeros catiónicos também sejam bioadesivos. Estas propriedades facilitam a penetração das cadeias poliméricas na mucina, a principal proteína do muco, permitindo interações físicas e mecânicas (Bansil e Turner, 2006).

A seleção do polímero está condicionada, em grande parte pela natureza do princípio ativo que se pretende incorporar no sistema. Quando o fármaco é hidrofílico recorre-se, em geral, a polímeros de natureza apolar e a preparação deve ocorrer em meio não aquoso, no caso de princípios ativos hidrofóbicos, deve ser selecionado um método de obtenção em meio aquoso, com recurso a polímeros de natureza hidrofílica (Severino *et al.*, 2011).

As MPs podem ser produzidas com polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos. Entre os polímeros naturais estão os proteicos (colagénio, gelatina e albumina do soro humano e bovino) e os polissacáridos (alginato, dextrano, ácido hialurónico e quitosano) (Park *et al.*, 2005). As vantagens desta classe de polímeros incluem a bioadesão às mucosas, nomeadamente à nasal e gastrointestinal, proporcionando elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade e, por isso, uma maior BD dos fármacos administrados, com o mínimo recurso a solventes orgânicos (Pandey e Khuler, 2004a). Além disso, a sua aprovação para uso humano pela Food and Drug Administration (FDA) são vantagens adicionais (Pandey e Khuler, 2004a). Contudo, sofrem variação entre os lotes, devido ao processo de obtenção e purificação (Briones *et al.*, 2008). Com respeito aos polímeros sintéticos, o seu custo é mais elevado e podem ser potencialmente antigénicos, ocorrendo alguma toxicidade quando degradados ou hidrolisados. Mas ao contrário dos naturais, mantém-se a reprodutibilidade dos lotes (Jain, 2000). Estão neste grupo, os poli(ésteres alifáticos), poli(ortoésteres), poli(fosfoésteres), poli(alquilo- $\alpha$ -cianoacrilatos), poli(amidas), poli(uretanos), polianidridos. Os poliésteres alifáticos são os mais estudados para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (Jain, 2000) e incluem o poli(ácido láctico) (PLA),

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

poli(ácido glicólico) PGA, poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) e o poli(ácido D,L-láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (Nair e Laurencin, 2007).

O PLGA é um copolímero constituído por PLA e PGA e tem sido o mais estudado no desenvolvimento de sistemas de libertação inovadores de fármacos, por ser altamente biodegradável e biocompatível e, pela possibilidade do controlo da sua biodegradabilidade pela variação da proporção dos polímeros que o constituem (Park *et al.*, 2005). O PLA possui um carbono  $\alpha$ -assimétrico, apresentando dois estereoisómeros, o poli(ácido L-láctico) (PLLA) e o poli(ácido D-láctico) (PDLA). A mistura racémica de ambos conduz à síntese do poli(ácido D,L-láctico) (PDLLA), opticamente inativo (Jalil e Nixon, 1990). O PLLA e o PDLA são polímeros semicristalinos, devido à elevada regularidade das suas cadeias poliméricas, enquanto o PDLLA é amorfo (Park *et al.*, 2005). Dos dois isómeros, o PLLA é o mais frequentemente usado, porque o ácido L-láctico é o estereoisómero de ocorrência natural, não apresentando toxicidade para o organismo. Relativamente ao PGA, este é altamente cristalino e não possui os grupos metilo laterais apresentados pelo PLA (Park *et al.*, 2005). É mais hidrofóbico do que o PGA por isso, os copolímeros com maior proporção de ácido láctico são menos hidrofílicos, absorvem menos água e, conseqüentemente degradam-se mais lentamente do que os ricos em ácido glicólico (Severino *et al.*, 2011).

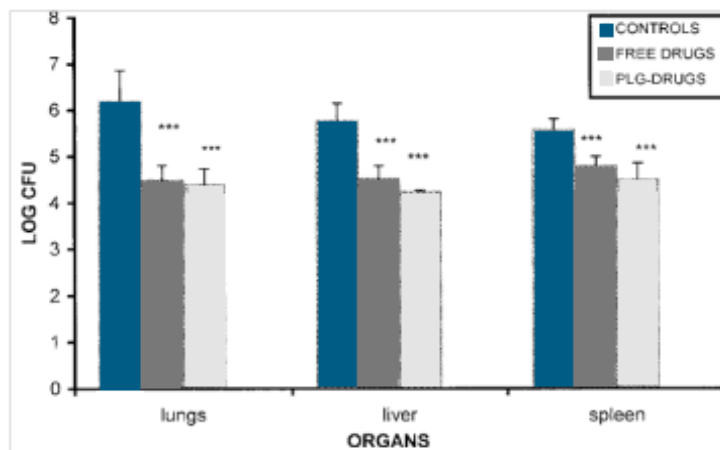
### **3.3.1 VEICULAÇÃO PASSIVA**

#### **3.3.1.1 VIA ORAL**

MPs de PLGA com INH, RIF e PZA foram administradas oralmente e apresentaram uma libertação prolongada dos fármacos. Na avaliação *in vitro*, a formulação manteve-se estável no ambiente ácido do fluido gástrico e no intestino a sua libertação ocorreu durante 20 dias (Ain *et al.*, 2002). Posteriormente, foi estudada a eficácia quimioterapêutica de microsferas de PLGA (com diâmetro inferior a 3  $\mu$ m) nas quais foram encapsulados os mesmos fármacos (INH, RIF e PZA) e administradas em ratinhos. Foram obtidas concentrações dos compostos acima da CMI, durante 72-120 h no plasma e até 9 dias nos vários órgãos (pulmões, fígado e baço), enquanto os agentes livres foram eliminados entre 12-24 h e 24 h, do plasma e dos órgãos, respetivamente. A BD relativa dos fármacos encapsulados no sistema (administrado semanalmente, num total de 6 doses) foi superior à dos fármacos livres e o sistema mostrou ser mais eficaz

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

ou equivalente na eliminação dos bacilos nos animais, em comparação com fármacos não formulados (administração diária, totalizando 35 doses) (Fig.3.13). Assim, as 35 doses usuais foram reduzidas para apenas 6 com resultados melhores ou semelhantes (Ain *et al.*, 2003a).



**Figura 3.13** – Log CFU nos pulmões, fígado e baço após quimioterapia com isoniazida, rifampicina e pirazinamida livres e encapsuladas nas micropartículas de PLGA, em ratinhos infetados pelo *M. tuberculosis*. \*\*\* $P < 0.001$  (Ain *et al.*, 2003a).

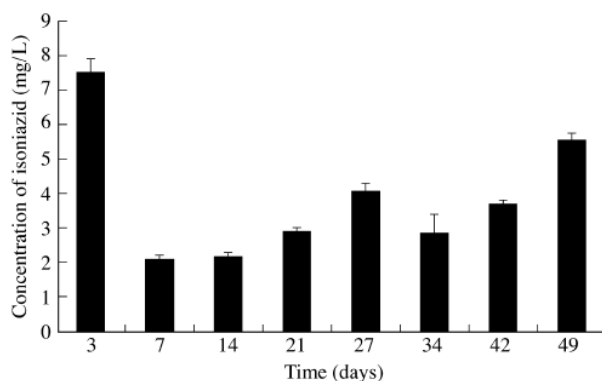
Ainda os mesmos autores desenvolveram também MPs de alginato para a veiculação oral dos três agentes, em cobaias, ocorrendo a sua libertação prolongada, durante 3-5 dias, no plasma e até 9 dias nos órgãos e a BD relativa foi cerca de 9 vezes superior à dos fármacos não formulados. O aumento da BD foi explicado pelas propriedades mucoadesivas que permitiram ao alginato permanecer na mucosa intestinal por um maior período de tempo. Quanto à eficácia quimioterapêutica, as cobaias infetadas com o *M. tuberculosis* H37Rv às quais foi administrada a formulação (1 dose semanal por 8 semanas), não apresentaram bacilos detetáveis no baço e pulmão, tendo ocorrido aparentemente a esterilização e o mesmo ocorreu com os compostos ativos livres, administrados diariamente. Além disso, o fígado dos animais tratados com os agentes encapsulados apresentou uma morfologia normal, enquanto no grupo que recebeu os compostos não encapsulados houve evidência de alterações hepáticas (Ain *et al.*, 2003b). Para melhorar o sistema foram usadas MPs de alginato e quitosano com obtenção de uma elevada eficiência de encapsulação (65 a 85%) e de carga dos fármacos. A administração a cobaias, de uma única dose oral dos fármacos encapsulados nas concentrações terapêuticas, permitiu a libertação prolongada no plasma e nos órgãos por 7 e 9 dias, respetivamente, mas com os compostos na forma livre a eliminação ocorreu ao fim de 12 h (plasma) e 2 dias (órgãos). A administração de

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

concentrações sub-terapêuticas também conduziu à liberação prolongada no plasma (5 dias) e órgãos (7 dias). Nas cobaias infetadas pelo *M. tuberculosis* H37Rv, a dose terapêutica (dada a cada 10 dias, totalizando 5 doses) e metade da dose terapêutica (dada a cada 7 dias, num total de 7 doses) dos princípios ativos encapsulados produziu uma eliminação dos bacilos nos órgãos, semelhante à da terapia convencional (46 doses). O sistema poderá assim, ser vantajoso na redução da dose e da frequência de administração (Pandey e Khuller, 2004a).

### **3.3.1.2 VIA PARENTERAL**

Dutt e Khuller (2001a) prepararam MPs com polímeros de PLGA carregadas com INH, que permitiram a sua liberação prolongada até 7 semanas, *in vitro* e *in vivo* (injeção uma vez por mês). As concentrações da INH foram muito superiores à CMI, sem evidências de hepatotoxicidade característica da INH, verificada nos controlos. A mesma dose do fármaco livre foi eliminada após 12 horas no plasma e 24 h nos órgãos. Os mesmos investigadores desenvolveram MPs onde co-encapsularam a INH e a RIF e uma única dose destas partículas, cujo diâmetro era superior a 10 µm, administrada pela via s.c. a ratinhos, permitiu a liberação prolongada dos fármacos entre 6-7 semanas (Fig.3.14), enquanto os agentes terapêuticos livres injetados nas mesmas doses, foram eliminados em 24 h. Anteriormente Cox e Coulter (1997) tinham observado que as partículas poliméricas com tamanho  $\geq 10$  µm permanecem no local da injeção, formando um depósito, a partir do qual os fármacos encapsulados são libertados gradualmente, culminando com a degradação do polímero. Na avaliação da eficácia quimioterapêutica, uma única administração da formulação com uma dose menor, a ratinhos infetados com o *M. tuberculosis* H37Rv, eliminou os bacilos com maior eficácia dos pulmões e fígado, enquanto a dose mais elevada permitiu uma maior eliminação dos microrganismos no fígado, comparativamente à dose diária (durante 6 semanas) dos fármacos livres (Dutt e Khuller 2001b).



**Figura 3.14** - Concentrações plasmáticas médias da isoniazida encapsulada nas micropartículas poliméricas contendo rifampicina e isoniazida (Dutt e Khuller 2001b).

Barrow e os seus colaboradores (1998) avaliaram a capacidade das MPs de PLGA para transportar a RIF para os macrófagos. Os ensaios mostraram a libertação do composto ativo, durante o período experimental (7 dias) nas linhas celulares de macrófagos de ratinhos (J774) e na humana Mono Mac 6 (MM6). Verificou-se um direcionamento eficaz das MPs de tamanho inferior a 10  $\mu\text{m}$ , aumentando a concentração intracelular do fármaco e, conseqüentemente a eliminação das CFUs dos macrófagos infetados, comparando com a RIF não encapsulada. A toxicidade do fármaco para ambas as linhas celulares com a formulação foi reduzida. Por sua vez, Quenelle *et al.* (1999) investigaram a eficácia de MPs de PLGA pequenas (7.5–8.8  $\mu\text{m}$ , administradas i.p. duas vezes), com o objetivo de transportar o fármaco para os macrófagos do hospedeiro e MPs grandes (101.1–130.2  $\mu\text{m}$ , administradas s.c. uma única vez) para a veiculação sistêmica, carregadas com RIF, a ratinhos infetados pelo *M. tuberculosis* H37Rv. Foi também ensaiada administração da combinação das MPs pequenas e grandes. As MPs grandes ou a combinação levou a uma diminuição significativa da contagem bacteriana nos pulmões, após 26 dias e não foram detetados bacilos em 2 e 4 ratinhos em cada um dos grupos de 10 animais submetidos a cada um dos tratamentos, respetivamente. A MPs pequenas não produziram uma redução significativa das CFUs, que os autores atribuíram à formação de agregados na cavidade peritoneal, reduzindo o número de partículas que atingiram a circulação. Contudo esta conclusão deixa muitas dúvidas, pois anteriormente foi relatado que as MPs injetadas i.p. localizam-se geralmente por toda a cavidade não se observando agregados de grande tamanho (Nakaoka *et al.*, 1996). Posteriormente, o mesmo grupo melhorou a capacidade de carga das microsferas pequenas de PLGA (diâmetro médio entre 1-10  $\mu\text{m}$ ) em 4 vezes para o transporte da RIF e para a combinação dessa formulação com a

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

administração da INH pela via oral, em ratinhos infetados pelo *M. tuberculosis* H37Rv. O tratamento com o fármaco encapsulado nas microsferas reduziu significativamente o número de CFUs nos pulmões e baço, após 26 dias. Por outro lado, a INH sozinha apresentou uma redução das CFUs para doses entre 12.5-1.56 mg/kg, enquanto o tratamento combinado com as microsferas permitiu reduzir a dose da INH para 0.39 mg/kg. Assim, devido à propriedade de libertação prolongada, as MPs permitiram a redução da dose do fármaco administrado pela via oral e minimizaram os efeitos adversos e a frequência de administração (Quenelle *et al.*, 2001).

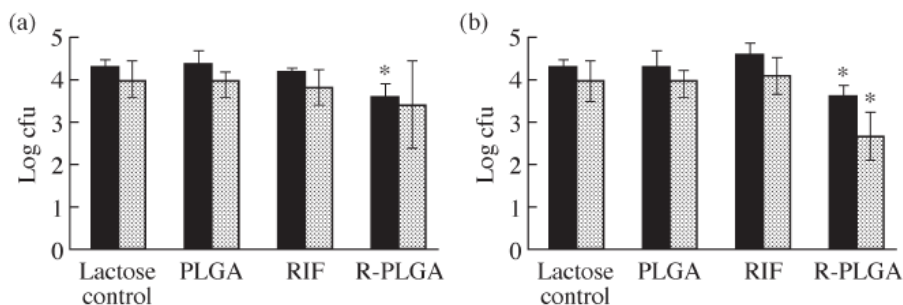
A CLR usada para as infeções do trato respiratório foi preparada em microsferas de albumina de soro humano, com diâmetros entre 7-15  $\mu\text{m}$  e injetadas na veia da cauda de ratinhos. A acumulação das microsferas nos pulmões começou aos 10 min e aumentou gradualmente até às 6 h, ocorrendo depois a diminuição. Após 24 h as microsferas ainda continuavam presentes. No fígado não foi observada qualquer acumulação (Ozkan *et al.*, 2000).

### 3.3.1.3 VIA PULMONAR

MPs de PLLA (diâmetro de 1-3  $\mu\text{m}$ ) foram preparadas para encapsular o pró-fármaco ionizável metanossulfato de isoniazida (INHMS). O fármaco foi eficientemente transportado para os MAs de rato (NR8383). No estudo *in vivo*, os autores compararam os níveis de INH nos macrófagos broncoalveolares, por administração por instilação intratraqueal da formulação, enquanto outros animais receberam a solução de INH por sonda esofágica ou administrada por via intratraqueal a ratos. Apenas as MPs carregadas com a INH permitiram a libertação prolongada e a veiculação direcionada da INH para os MAs. Além disso, ocorreu uma redução significativa do efeito de primeira passagem, o que permitiu minimizar a formação do metabolito principal e potencialmente tóxico, a acetilisoniazida (AcINH) (Zhou *et al.*, 2005). Mais recentemente, Muttill *et al.* (2007) usaram também MPs de PLLA de elevada carga de fármaco para serem formuladas como pó seco e transportarem a INH e a RIF para os MAs. A administração a ratinhos foi feita por inalação ou por instilação intratraqueal, enquanto os fármacos em solução foram administrados oralmente ou por injeção cardíaca. As MPs tinham um tamanho de partícula de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  e o aerossol apresentou características aerodinâmicas satisfatórias. A maioria das MPs libertou os fármacos em 10 dias e as concentrações intracelulares dos agentes

terapêuticos foram cerca de 20 vezes superiores por comparação com a administração das soluções.

O'Hara e Hickey (2000) foram bem-sucedidos na obtenção de MPs respiráveis de PLGA com a RIF, através dos métodos de evaporação do solvente e de secagem por aspersão, conseguindo uma carga de fármaco de 20 e 30% e com diâmetros médios de volume de 3.45 e 2.76  $\mu\text{m}$ , com cada uma das técnicas, respetivamente. Noutro trabalho, cobaias infetadas pelo *M. tuberculosis* (H37Rv) foram tratadas com a formulação de microsferas de PLGA contendo a RIF, por insuflação e nebulização. O tratamento com apenas uma única dose (por insuflação antes da infeção) ou com duas doses da formulação (uma antes da infeção, por insuflação e outra, por inalação, depois da infeção) reduziu significativamente o número de bactérias viáveis (Fig.3.15), marcadores de inflamação e danos no pulmão, comparado com as microsferas sem fármaco ou com a RIF livre, 28 dias após a infeção. Contudo, enquanto a dose dupla reduziu a carga bacteriana nos pulmões e baço, a administração de apenas uma dose só foi eficaz na diminuição da carga bacteriana pulmonar. A combinação complexa do regime com dose dupla profilática/terapêutica precisa de ser estudada mais profundamente (Suarez *et al.*, 2001a; Suarez *et al.*, 2001b).

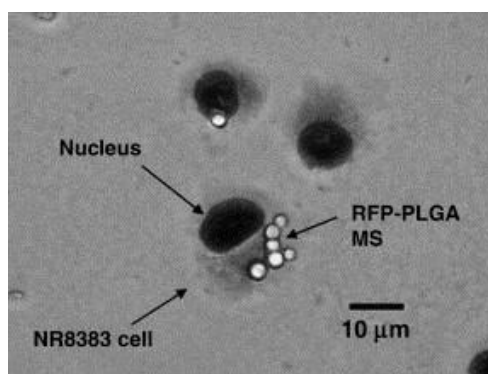


**Figura 3.15** - Bactérias viáveis (CFU/mL) nos pulmões (■) e no baço (▨) após (a) insuflação de uma dose única de rifampicina (RIF) em micropartículas de PLGA (12 mg/kg), PLGA ou RIF (12 mg/kg). (b) Doses duplas: insuflação (12.0 mg/kg) e nebulização da RIF encapsulada nas micropartículas (equivalente a 5 mg/kg de RIF), PLGA ou RIF (17 mg/kg). \* $P < 0.05$  (Suarez *et al.*, 2001a).

Garcia-Contreras *et al.* (2006) também usaram cobaias infetadas com TB sujeitas a tratamentos com uma única dose ou com doses múltiplas (1 dose/semana) de microsferas de PLGA carregadas com RIF e administraram-nas por inalação e compararam com aerossóis das suspensões micronizadas do fármaco. Além disso, ensaiaram também a formulação desenvolvida (administrada uma vez/semana) com doses diárias de suspensões de RIF (dadas durante 10 e 20 dias consecutivos). A RIF

encapsulada teve um efeito positivo na proteção do baço contra a infecção, pois verificou-se uma redução da inflamação e a na contagem das bactérias viáveis em comparação com os animais tratados com as suspensões. Relativamente à segunda parte do estudo, a RIF não formulada, administrada durante 10 ou 20 dias reduziu a inflamação pulmonar e esplênica, mas não o número de bactérias viáveis nos pulmões. O efeito da RIF livre administrada por 20 dias foi semelhante à da dose única do fármaco encapsulado, na redução da população bacteriana no baço. O estudo evidencia o potencial da terapia inalada para o tratamento da TB, mas o sistema precisa ser melhorado para permitir uma maior capacidade de carga e tamanho otimizado das partículas.

A fagocitose de MPs de PLGA (diâmetros entre 1-10  $\mu\text{m}$ ) com a RIF incorporada, pelos MAs (linha celular NR8383) foi fortemente influenciada pelo tamanho e número de partículas adicionado às células. As partículas fagocitadas apresentavam um tamanho entre 3-6  $\mu\text{m}$ . A veiculação mais eficiente da RIF para cada célula e para uma grande população de macrófagos foi conseguida através da fagocitose de MPs de 3  $\mu\text{m}$  (Hirota *et al.*, 2007). Mais recentemente, estes autores usando a mesma formulação e administrada também a MAs da linha celular NR8383 (Fig.3.16) de ratos infectados com o BCG mostraram que a RIF foi eficientemente transportada para as células por comparação com o fármaco livre, induzindo um efeito bactericida potente. As microsferas de PLGA com o fármaco não apresentaram toxicidade, pois a sua fagocitose não estimulou a produção de qualquer mediador inflamatório (TNF- $\alpha$ , óxido nítrico (NO), interleucina-10) e foi considerada biologicamente segura para os pulmões (Hirota *et al.*, 2010).



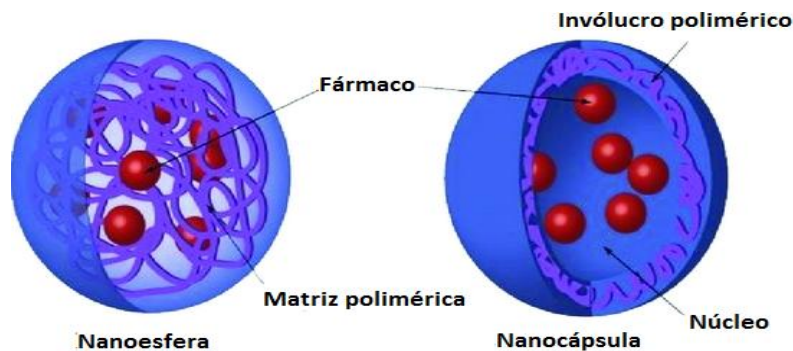
**Figura 3.16** - Observação microscópica de células NR8383 após a sua incubação com microsferas de 3  $\mu\text{m}$  de PLGA contendo rifampicina (ampliação de 1000X) (Hirota *et al.*, 2010).

MPs de PLA administradas em ratinhos mostraram que estas, além de transportarem eficientemente os fármacos para os MAs, também desencadearam estratégias de defesa do hospedeiro. As MPs provocaram a ativação da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) oxidase que leva à formação de intermediários reativos de oxigênio (ROI) e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), com a consequente formação de RNI e promoveu eficientemente a secreção de TNF- $\alpha$ , pelos macrófagos. Assim, a fagocitose das MPs induziu respostas indicadoras da ativação dos mecanismos bactericidas inatos que provavelmente aumentam a ação dos fármacos (Sharma *et al.*, 2007). Num ensaio *in vitro* em células da linha celular humana THP-1 e *in vivo* em ratinhos foi também investigado o transporte de MPs de PLA inaláveis incorporando a INH e a RIF. Nas culturas celulares, a concentração intracelular da INH manteve-se por 24 h e da RIF por 96 h. No estudo *in vivo*, foi conseguida a veiculação direcionada para os pulmões e mais especificamente para os MAs. As MPs reduziram a frequência de administração e aumentaram o índice farmacológico dos fármacos (Verma *et al.*, 2008).

A OFLX foi encapsulada em microsferas de hialuronato para serem administradas pela via pulmonar a ratos. Estas partículas (diâmetro médio 2–5  $\mu\text{m}$ ) apresentaram boa eficiência de aerossolização quando combinadas com lactose e transportaram eficientemente o fármaco para os pulmões. Como o hialuronato forma um gel mucoadesivo em contacto com os fluidos broncoalveolares, a incorporação da OFLX pelos macrófagos foi superior em relação ao fármaco em solução. Além disso, o hialuronato é segregado endogenamente no pulmão e é biodegradável nos MAs, protegendo contra várias doenças respiratórias (Cantor e Turino, 2004) e evita também o espessamento pleural que ocorre nos pacientes com TB (Zhou *et al.*, 2003). A administração intratraqueal das microsferas com a OFLX resultou numa BD sistémica inferior a 50% em relação à administração i.v. (100%) ou oral (91.7%) que poderá dever-se ao alcance incompleto da dose inalada para o local de absorção, localizado no pulmão ou a uma absorção sistémica reduzida do fármaco a partir do pulmão. Esta observação suporta a ideia que as MPs inaladas podem reduzir os efeitos adversos sistémicos, mas também sugere que as terapias inaladas sozinhas podem não ser eficientes para tratar a TB extrapulmonar. Por outro lado, a concentração no fármaco no pulmão foi muito superior através da administração intratraqueal (Hwang *et al.*, 2008).

### 3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas (NPs) poliméricas são sistemas coloidais com um diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ , desenvolvidos para constituírem uma alternativa aos lipossomas, devido aos seus problemas de baixa eficiência de encapsulação, extravasamento dos fármacos e baixa estabilidade durante o armazenamento (Vila *et al.*, 2002). Dependendo da tecnologia usada na sua produção, podem ser geradas nanoesferas ou nanocápsulas (Fig.3.17) (Araújo *et al.*, 2009). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico que rodeia um núcleo aquoso ou oleoso, em que o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas não contêm óleo na sua formulação, sendo formadas por uma matriz polimérica de porosidade variável, onde o fármaco é adsorvido, dissolvido ou disperso (Schaffazick *et al.*, 2003). No organismo, os fármacos são habitualmente libertados a partir da matriz por difusão, intumescimento, erosão ou degradação (Gelperina *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010).



**Figura 3.17** – Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas (adaptado de Christoforidis *et al.*, 2012).

As NPs podem ser preparadas a partir dos mesmos materiais poliméricos biocompatíveis e biodegradáveis usados nas MPs. A seleção dos materiais da matriz depende de muitos fatores incluindo o tamanho pretendido das NPs; propriedades do fármaco, como por exemplo a solubilidade e a estabilidade; características da superfície (carga e a permeabilidade); perfil de libertação do fármaco pretendido; biodegradabilidade, biocompatibilidade, toxicidade e da antigenicidade das NPs (Mohanraj e Chen, 2006). Possuem elevada estabilidade e capacidade de transporte, isto é, muitas moléculas de fármaco podem ser incorporadas na matriz; apresentam viabilidade para incorporar substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas e permitem a libertação prolongada a partir da matriz. A libertação do agente ativo é afetada pelo tamanho das partículas. As partículas menores têm maior área superficial, logo a maioria do fármaco irá estar na

superfície ou perto dela, levando a uma libertação rápida do mesmo. Estas partículas têm também maior risco de agregação, durante o armazenamento (Redhead *et al.*, 2001). Por outro lado, as maiores têm um núcleo maior que permite que mais princípio ativo seja encapsulado e seja difundido lentamente (Redhead *et al.*, 2001).

Comparativamente às MPs, as NPs parecem ser mais vantajosas como sistemas de veiculação de fármacos, pois geralmente, possuem capacidade de transportar maiores quantidades de fármacos, minimizarem o consumo de polímeros e conseguem uma melhor resposta terapêutica (Pandey e Khuller, 2004c; Rao *et al.*, 2004). Além disso, as NPs inaláveis apresentam melhores possibilidades de aderir à mucosa pulmonar, e assim veicular o fármaco para os pulmões (Jacobs e Muller, 2002; Panyam *et al.*, 2003).

A superfície das NPs pode ser quimicamente modificada por ligandos, como as lectinas, para obter um direcionamento específico dos fármacos antimicrobianos para os locais alvo. Esta conjugação com as lectinas parece melhorar a mucoadesão das NPs, devido ao biorreconhecimento dos transportadores pelas estruturas glicosiladas presentes nas mucosas do intestino e nos alvéolos, o que aumenta a sua BD pela residência prolongada no local de absorção (Mo e Lim, 2004). A funcionalização com aglutinina do gérmen de trigo, uma lectina de baixa imunogenicidade permite a sua interação com os recetores de lectina do epitélio intestinal/alveolar, o que favorece o seu uso para a veiculação oral e em aerossol (Clark *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2004b).

As vias de administração das NPs incluem a oral, parenteral e a inalação (Pandey *et al.*, 2003a; Pandey *et al.*, 2003b, Gelperina *et al.*, 2005). Em contraste com as MPs que não podem ser administradas pela via i.v., as NPs são suficientemente pequenas para permitirem a passagem intracápsular (Gelperina *et al.*, 2005). Após a administração por esta via, as NPs podem interagir com proteínas do sangue, as opsoninas, o que leva à sua rápida eliminação da corrente sanguínea e captura pelos macrófagos do SFM (fígado, baço e pulmões e medula óssea) (Grislain *et al.*, 1983; Muller e Wallis, 1993). Este facto, que poderia ser uma desvantagem no tratamento de algumas infeções, constitui um transporte passivo dos fármacos antituberculosos para o interior dos macrófagos e faz das partículas poliméricas candidatos excepcionais para o tratamento das infeções intracelulares que afetam o SFM (Gelperina *et al.*, 2005; Imbuluzqueta *et al.*, 2010).

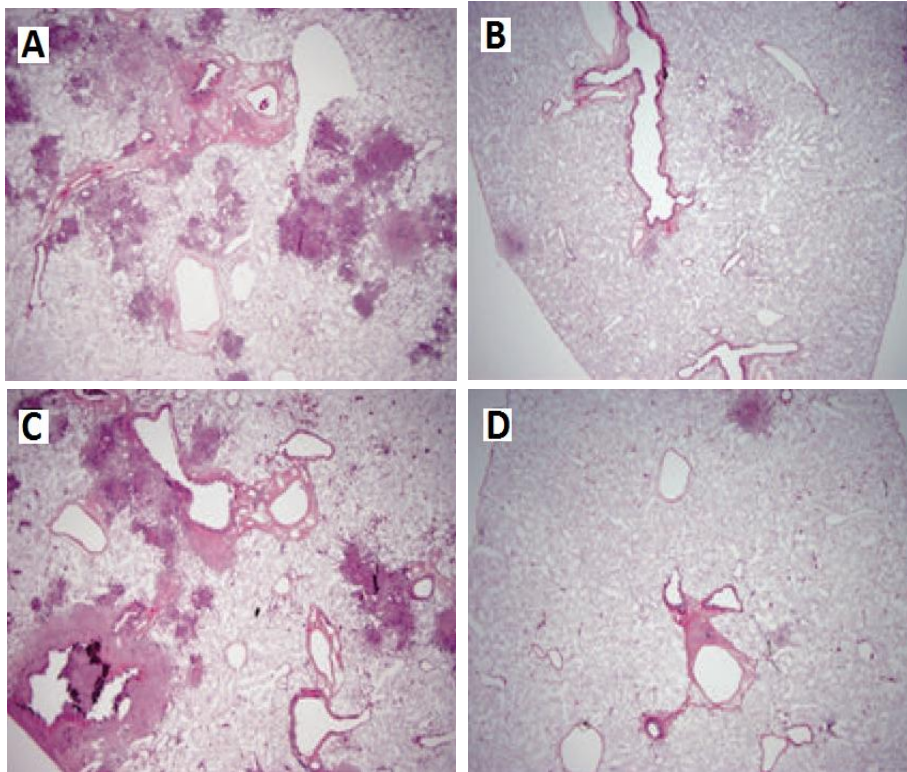
### 3.4.1 VEICULAÇÃO PASSIVA

#### 3.4.1.1 VIA ORAL

Pandey *et al.* (2003b) desenvolveram uma formulação para administração oral com RIF, INH e PZA encapsuladas em NPs de PLGA. Em ratinhos, observou-se a libertação prolongada dos fármacos, pois foram detetados no plasma, nas concentrações terapêuticas, durante 6 dias para a RIF e 9 dias para INH/PZA, enquanto nos tecidos, as concentrações terapêuticas mantiveram-se por 9-11 dias, após uma única administração oral das NPs. Os fármacos livres foram eliminados do plasma após 12-24 h. Cinco doses orais da formulação, espaçadas por 10 dias, foram suficientes para conseguir a clearance bacteriana dos órgãos infetados com bacilos da TB, mas com os compostos livres foram necessárias 46 doses (uma por dia) para obter os mesmos resultados. O mesmo grupo avaliou a eficácia destes três agentes de primeira linha (INH, RIF e PZA) co-encapsulados em NPs de PLGA com 2/3 da dose terapêutica respetiva, em cobaias. Uma única administração oral resultou na libertação prolongada no plasma, durante 7-12 dias e nos órgãos entre 11-14 dias, com um aumento significativo do tempo de residência médio e da BD dos compostos ativos. No caso dos fármacos não formulados, estes foram eliminados em 12 h. Nos animais infetados com o bacilo da TB H37Rv, o sistema administrado a cada 10 dias, num total de 5 doses, eliminou os microrganismos do baço e dos pulmões, tal como as 46 doses convencionais, na mesma concentração. A formulação poderá assim ser útil na redução da frequência de administração e também da dose (Sharma *et al.*, 2004a). Posteriormente, Pandey *et al.* (2006a) usaram NPs de PLGA com EMB e NPs contendo INH, RIF e PZA. Apenas com uma única administração a ratinhos, as concentrações dos fármacos foram mantidas no plasma por 5 dias e nos órgãos (pulmões, fígado e baço), por 7-9 dias. Os parâmetros farmacocinéticos ( $t_{1/2}$  e o tempo de residência) foram melhorados em relação aos compostos ativos livres, e as BD relativa e absoluta dos quatro fármacos aumentaram significativamente. As doses da formulação dadas repetidamente não evidenciaram hepatotoxicidade. Nos animais infetados pelo *M. tuberculosis* H37Rv, apenas 3 doses orais da formulação (com um intervalo de 10 dias entre elas) com INH, RIF e PZA, suplementada com as NPs de EMB, eliminaram os bacilos nos órgãos, mas foram necessárias 28 doses convencionais dos compostos não formulados para obter resultados semelhantes. No seguimento destes trabalhos Pandey *et al.* (2006b) relataram

que uma dose oral de NPs com RIF, INH, PZA e EMB incorporados, em ratinhos manteve as concentrações dos fármacos em vários tecidos, durante 9-10 dias e não despoletou nenhuma resposta adversa quando os compostos foram usados numa dose 150 vezes superior à dose terapêutica recomendada, mas a mesma dose com os fármacos livres foi letal. As administrações múltiplas da formulação, a cada 10 dias, não provocaram toxicidade subaguda (durante 28 dias), nem crónica (durante 90 dias). Nos ratinhos com elevada carga bacteriana, foram ensaiados dois regimes independentes, no primeiro 5 doses (espaçadas por 10 dias) de NPs com a RIF, INH, PZA e EMB encapsulados e no segundo, 2 doses (espaçadas por 10 dias) de NPs com a RIF, INH, PZA e EMB encapsulados seguidas de 3 doses (intervaladas por 10 dias) das NPs contendo apenas a RIF e a INH, resultaram na eliminação dos bacilos dos pulmões e do baço. Esta eficácia foi comparável a 46 doses (1 por dia) dos fármacos não encapsulados.

Johnson *et al.*, (2005) usaram cobaias infetadas pelo *M. tuberculosis* e avaliaram o tratamento oral com sacarose (controlo), com os fármacos (INH, RIF, PZA) na forma livre, ambos administrados diariamente, num total de 46 doses e também com NPs de PLGA vazias e NPs com os compostos ativos encapsulados, ambas fornecidas a cada 10 dias (5 doses no total). As NPs vazias não alteraram a carga bacteriana nos órgãos, quando comparadas com os controlos. Nos casos em que estavam presentes os fármacos (formulados e não formulados), ocorreu uma redução significativa da contagem bacteriana e da histopatologia do pulmão. O estudo histopatológico do pulmão evidenciou que os animais controlo apresentaram numerosas lesões graves com o envolvimento extenso do parênquima com evidência de necrose e progressão da doença, enquanto as cobaias tratadas com os agentes livres ou encapsulados apresentaram apenas pequenos focos de fibrose com o envolvimento mínimo do parênquima (Fig.3.18).



**Figura 3.18** - Fotomicrografias representativas dos pulmões de cobaias infetadas com o *Mycobacterium tuberculosis*, após 6 semanas de quimioterapia. As preparações foram coradas com hematoxilina e eosina.

Animais tratados com sacarose (A) e nanopartículas (NPs) vazias (C) apresentaram muitas lesões graves com envolvimento do parênquima pulmonar. As lesões evidenciaram necrose com mineralização, o que reflete a progressão da doença. Por outro lado, os animais tratados com os fármacos (INH, RIF e PZA) livres (B) e encapsulados nas NPs (D) mostraram menos lesões com um envolvimento mínimo do parênquima pulmonar, com focos discretos de fibrose e inflamação (Johnson *et al.*, 2005).

Num trabalho desenvolvido por Pandey e Khuller (2007) foi tentado o desenvolvimento de um sistema oral para veicular a estreptomicina (STR), um antibiótico injetável, através da preparação de NPs de PLGA. As partículas apresentaram um tamanho médio de 153.12 nm com uma percentagem de encapsulação de  $32.12 \pm 4.08\%$ . A concentração do princípio ativo foi mantida no plasma, por 4 dias e por 7 dias nos órgãos (pulmões, fígado e baço), após uma única dose oral da formulação e houve um grande aumento (21 vezes) na BD do fármaco encapsulado relativamente à STR livre (administrada pela via i.m.). Além disso, a formulação não apresentou nefrotoxicidade. Nos ratinhos infetados pelo *M. tuberculosis* H37Rv, 8 doses orais (1 dose/semana) resultou num efeito comparável a 24 injeções i.m. da STR não formulada. Este estudo foi muito importante, na medida em que poderá ser útil para o

desenvolvimento de um sistema para transportar a STR pela via oral e até mesmo, outros antibióticos injetáveis.

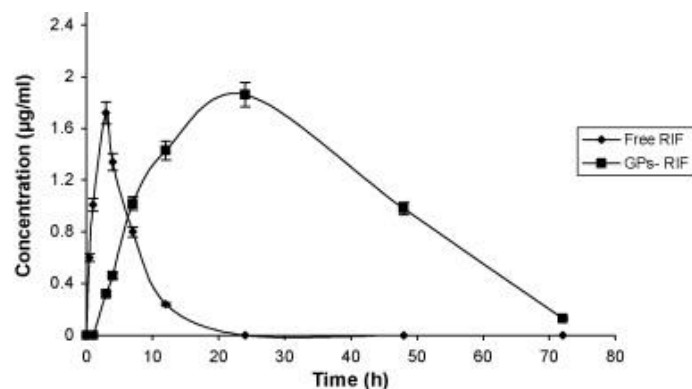
Outros trabalhos basearam-se no uso de polímeros naturais como o alginato. Este polímero foi usado para o transporte da RIF, INH, PZA e EMB. A eficiência de encapsulação foi elevada, variando de 70-90% e houve um aumento significativo da BD relativa, em que uma só dose das NPs permitiu manter as concentrações terapêuticas durante 7-11 dias no plasma e por 15 dias nos órgãos (pulmões, fígado e baço). Por outro lado, os fármacos não formulados foram eliminados do plasma e dos órgãos em apenas 12-24 h. Nos ratinhos infetados pelo *M. tuberculosis*, apenas 3 doses orais das NPs (1 dose com INH, RIF, PZA e EMB e 2 doses com a INH e a RIF), dadas com um intervalo de 15 dias permitiram a clearance completa das bactérias dos órgãos, mas foram necessárias 45 doses orais dos agentes livres (15 dias com os quatro agentes, seguidos de 30 dias com INH e RIF) para um resultado semelhante (Ahmad *et al.*, 2006a).

Em estudos anteriores, os azóis mostraram ter uma potente atividade antituberculosa, bem como sinergismo com os antituberculosos convencionais (Guardiola-Diaz *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2005a; Ahmad *et al.*, 2006b; Ahmad *et al.*, 2006c). Contudo, apesar da elevada potencialidade do econazol para tratar a TB latente e ativa, a sua BD pela via oral é fraca. Ahmad *et al.* (2007) usaram NPs de alginato para incorporar o econazol e também NPs com vários antituberculosos e avaliaram o seu potencial quimioterapêutico em ratinhos. Todos os fármacos antituberculosos foram detetados nos órgãos (pulmões, fígado e baço) acima das CMI, até 15 dias e até 8 dias para o econazol, mas os compostos livres só foram detetados durante 12-24 h. Oito doses (1 por semana) do antifúngico incorporado nas NPs ou 112 doses (duas doses/dia) do fármaco livre reduziram a carga bacteriana em mais de 90% nos pulmões e no baço dos animais infetados. Além disso, neste trabalho, o econazol (livre ou encapsulado) também foi eficaz na substituição da RIF ou da INH. As NPs de alginato reduziram a frequência de administração do econazol e também dos fármacos convencionais em 15 vezes.

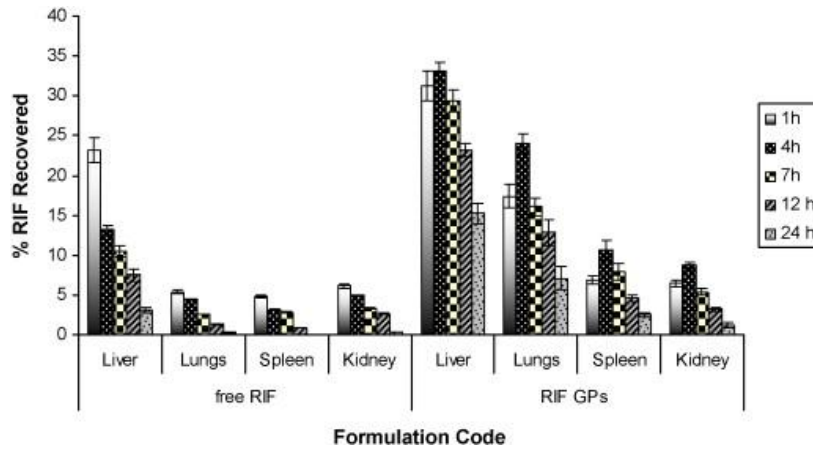
### 3.4.1.2 VIA PARENTERAL

Pandey e Khuller (2004b) estudaram os três fármacos de primeira linha (INH, RIF e PZA) em NPs de PLGA e administrados por via s.c. a ratinhos. Uma dose apenas produziu concentrações terapêuticas no plasma por 32 dias, e nos pulmões e no baço por 36 dias, enquanto os fármacos livres foram eliminados do plasma em 10-12 h e dos órgãos em 24-48 h. O tempo de residência médio e a BD absoluta aumentaram substancialmente (7 vezes) em relação aos compostos não formulados. Quanto à eficácia terapêutica, não foram detetadas bactérias nos pulmões e no baço dos ratinhos infetados com o *M. tuberculosis*, quando lhes foi administrada a formulação, numa dose s.c. única comparativamente à elevada carga bacteriana presente nos órgãos com os agentes não encapsulados administrados pela mesma via. A eficácia terapêutica foi também superior relativamente à administração oral diária (total de 35 doses).

Saraogi e colaboradores (2010) usaram NPs de gelatina para transportar a RIF, com um tamanho de  $264 \pm 11.2$  nm. A libertação da RIF apresentou um padrão bifásico, com uma libertação inicial elevada de 48% em 24 h, seguida pela libertação gradual e controlada de 81.4% em 72 h (Fig.3.19). As NPs não apresentaram citotoxicidade. Os ensaios de biodistribuição *in vivo* mostraram uma maior localização das NPs (via i.v.) nos vários órgãos ricos em macrófagos (pulmões, fígado e baço) em relação aos agentes em solução, dados por via oral (Fig.3.20). Além disso, a formulação (dada de 3 em 3 dias/4 semanas) diminuiu significativamente a contagem bacteriana nos pulmões e baço de ratinhos infetados, mas foram necessárias 28 doses orais convencionais (1 dose diária) para obter um resultado semelhante.

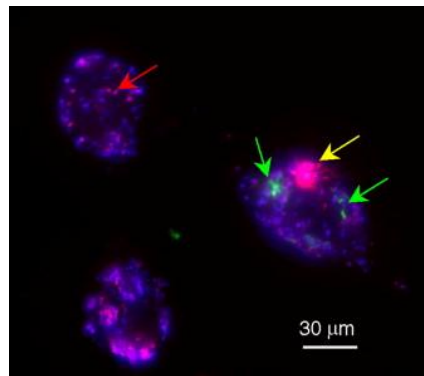


**Figura 3.19** - Concentração plasmática da rifampicina livre e encapsulada nas nanopartículas de gelatina (Saraogi *et al.*, 2010).



**Figura 3.20** - Distribuição da rifampicina livre e encapsulada nas nanopartículas de gelatina pelos órgãos *in vivo* (Saraogi *et al.*, 2010).

Mais recentemente, a atividade da moxifloxacina (MFLX) foi estudada contra o *M. tuberculosis*, em NPs biodegradáveis de poli(*n*-butilcianoacrilato) (PBCA), após administração *i.v.*. Ocorreu uma acumulação da MFLX nos macrófagos (Fig.3.21), cerca de três vezes mais eficiente do que o fármaco livre e foi detetado nas células, por um período seis vezes superior. A inibição do crescimento intracelular do microrganismo com o composto ativo encapsulado foi obtida com uma concentração de 0.1 µg/mL, mas para o mesmo efeito foi necessária MFLX livre 1 µg/mL (Kisich *et al.*, 2007).



**Figura 3.21** - Distribuição das nanopartículas de PBCA em relação ao *M. tuberculosis* intracelular. Pode-se observar macrófagos individuais (azul) contendo nanopartículas carregadas com rodamina (seta vermelha) e agregados maiores (seta amarela). Várias nanopartículas podem ser observadas na proximidade do *M. tuberculosis* intracelular (setas verdes) (Kisich *et al.*, 2007).

### 3.4.1.3 VIA PULMONAR

NPs de PLGA foram usadas para encapsular os três fármacos de primeira linha INH, RIF e PZA para administração por nebulização. As partículas aerossolizadas apresentaram um MMAD de  $1.88 \pm 0.11 \mu\text{m}$ , adequado para a veiculação broncoalveolar. Após uma única nebulização em cobaias, as concentrações terapêuticas dos fármacos mantiveram-se no plasma por 6-8 dias e nos pulmões até 11 dias, enquanto os compostos ativos não formulados não foram detectados após 24 horas, nem no plasma, nem nos órgãos. O  $t_{1/2}$  e o tempo de residência médio dos agentes co-encapsulados nebulizados foram significativamente superiores, comparativamente aos fármacos livres, administrados pela via oral, o que resultou num aumento da BD relativa. A BD absoluta (comparação com a via i.v.) também aumentou bastante, cerca de 6.5, 19 e 13 vezes para a RIF, INH e PZA, respetivamente. Como o objetivo estava centrado na deposição pulmonar, pode-se questionar em que é que o aumento da biodisponibilidade sistémica poderá ser vantajoso? Os autores argumentaram que ao haver este incremento poderá levar a que mais fármaco atinja os pulmões através da circulação, ou seja, o transbordo para a circulação sistémica poderá aumentar o transporte para os pulmões. A administração repetida da formulação (3 doses) não provocou hepatotoxicidade. Na avaliação da eficácia terapêutica, não foram detectados bacilos no pulmão dos animais previamente infetados pelo *M. tuberculosis* H37Rv, após 5 doses da formulação (com intervalo de 10 dias) e para um efeito equivalente foram necessárias 46 doses orais (1 vez/dia) (Pandey *et al.*, 2003a).

NPs de alginato com a INH, RIF e a PZA para administração em aerossol, apresentaram eficiências de encapsulação elevadas, entre 70-90% para a INH e a PZA e de 80-90% para a RIF. A maioria das partículas (cerca de 80.5%) estava no intervalo respirável, com um MMAD de  $1.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$  e um GSD de  $1.71 \pm 0.1 \mu\text{m}$ . Todos os fármacos encapsulados apresentaram BD relativas significativamente superiores às dos fármacos livres, administrados oralmente e todos foram detectados nos órgãos (pulmões, fígado e baço) acima da MIC até 15 dias após a nebulização, enquanto os fármacos não formulados foram eliminados após 24 h. A eficácia quimioterapêutica de três doses (com um intervalo de 15 dias entre cada uma), administradas por nebulização foi comparável com as 45 doses diárias dos agentes não formulados (Ahmad *et al.*, 2005b).

Um grupo desenvolveu há pouco tempo NPs de PLGA conjugadas com lactose, para a veiculação pulmonar da RIF. O tamanho das NPs foi de 121-184 nm e a

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

percentagem de encapsulação máxima foi de 38.4-42.2%. O perfil de libertação *in vitro* demonstrou que as NPs não acopladas à lactose libertaram uma percentagem superior de RIF e houve uma maior incorporação das NPs de PLGA modificadas no tecido pulmonar comparando com as NPs de PLGA sem lactose. A administração i.v. da solução do fármaco livre resultou numa elevada concentração da RIF no soro, mas no caso das NPs de PLGA essa concentração foi muito menor. O acoplamento das NPs à lactose aumentou significativamente a incorporação pulmonar do fármaco em relação às NPs com RIF sem lactose e também, no caso da solução do fármaco (Jain *et al.*, 2010).

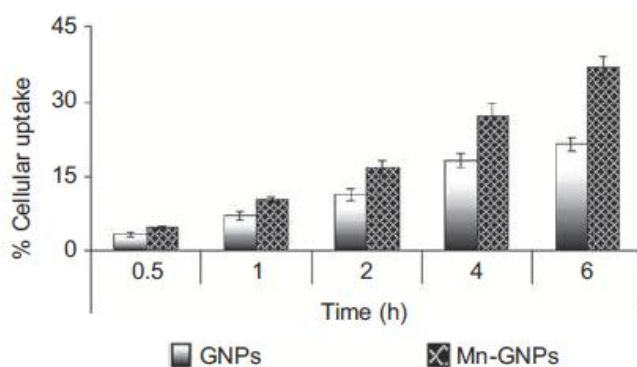
### **3.4.2 VEICULAÇÃO ATIVA**

#### **3.4.2.1 VIA ORAL**

Para conseguir uma formulação mais eficiente, o grupo de Sharma preparou NPs de PLGA funcionalizadas com lectina (aglutinina do gérmen de trigo) com propriedades bioadesivas, prolongando o tempo de residência no local de absorção, ao aumentar o contato com o epitélio que contém recetores para este ligando. Foram novamente usados os três agentes de primeira linha (INH, RIF e PZA) nas concentrações terapêuticas. As NPs apresentaram um tamanho no intervalo 350-400 nm e uma eficiência de encapsulação entre 54%–66%. O sistema foi administrado a cobaias pela via oral e na forma de aerossol. A RIF foi detetada no plasma até 6-7 dias e a INH e a PZA entre 13-14 dias, enquanto com as NPs não revestidas com a lectina, a RIF esteve presente no plasma por 4-6 dias e a INH e a PZA até 8-9 dias. Os três fármacos permaneceram nos órgãos (pulmões, fígado e baço), durante 15 dias acima da MIC para as NPs revestidas e 10 dias para as não revestidas. Os agentes não formulados foram eliminados entre 12-24 h. A conjugação com a lectina aumentou significativamente a BD relativa dos fármacos. Em relação à eficácia quimioterapêutica, não foram detetadas CFUs nos órgãos (pulmões, fígado e baço), após 3 doses, administradas quinzenalmente pela via oral e pulmonar e o mesmo resultado foi produzido por 45 doses dos agentes livres, administrados pela via oral. Assim, o sistema desenvolvido apresentou potencialidade para a veiculação dos agentes antituberculosos, por ambas as vias (Sharma *et al.*, 2004b).

### 3.4.2.2 VIA PARENTERAL

Saraogi *et al.* (2011) aperfeiçoaram as NPs de gelatina que haviam desenvolvido e adicionaram-lhes o ligando manose, de modo a conseguirem a veiculação ativa da INH para os MAs. As NPs apresentaram um tamanho entre 260-380 nm e a percentagem de encapsulação máxima foi de 40-55%. As NPs conjugadas com a manose mostraram ser eficientes na veiculação espacial da INH para os alvéolos (Fig.3.22). A administração i.v. da INH encapsulada nas NPs manosiladas, resultou numa redução significativa da contagem bacteriana, nos pulmões e no baço de ratinhos infetados com TB e também na redução da hepatotoxicidade causada pelo fármaco. Este estudo suporta a hipótese da formulação desenvolvida poder ser explorada para transportar os fármacos de modo direcionado para conseguir um tratamento seguro e eficaz da TB.



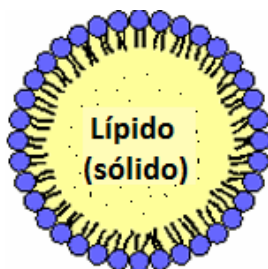
**Figura 3.22** - Incorporação celular da isoniazida transportada em nanopartículas de gelatina não manosiladas e manosiladas para os macrófagos alveolares (Saraogi *et al.*, 2011).

### 3.4.2.3 VIA PULMONAR

Como referido anteriormente, Sharma *et al.* (2004b) produziram NPs funcionalizadas com lectina para administração oral, mas também pulmonar, com o objetivo de encapsular os três fármacos de primeira linha (INH, RIF, PZA). As NPs modificadas mostraram ser capazes de eliminar os bacilos de vários órgãos (pulmões, fígado e baço), após 3 doses, administradas quinzenalmente e o mesmo resultado foi produzido por 45 doses dos agentes não formulados, administrados pela via oral.

### 3.5 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) são sistemas coloidais com diâmetros médios que variam entre 50 nm-1000 nm, compostos por lípidos que são sólidos à temperatura ambiente e corporal, biocompatíveis e biodegradáveis; surfactante(s) e água (Fig.3.23) (Muhlen *et al.*, 1998; Mehnert e Mader, 2001).



**Figura 3.23** – Estrutura de uma nanopartícula lipídica sólida (SLN) (adaptado de Ekambaram *et al.*, 2011).

Assemelham-se às nanoemulsões, mas o lípido no interior em vez de ser líquido (óleo) é sólido, o que permite a libertação mais controlada dos agentes ativos, porque a mobilidade deverá ser consideravelmente inferior comparada com uma fase oleosa (Martins *et al.*, 2007). Para a partícula lipídica se manter sólida após administração, o ponto de fusão dos lípidos deve ser superior à temperatura do organismo (37°C). Os lípidos com pontos de fusão elevados investigados incluem ácidos gordos, triglicéridos, esteróides, glicéridos e ceras. Relativamente aos surfactante, utilizados para estabilizar a dispersão lipídica, podem ser fosfolípidos presentes nas membranas como a lecitina de soja, PC e os copolímeros de óxido de etileno/óxido de propileno e Spans (Zhang *et al.*, 2010).

As duas técnicas principais para a produção das SLNs são a homogeneização a pressão elevada, descrita por Muller e Lucks (1996) e a técnica baseada na microemulsão desenvolvida por Gasco (1993).

As SLNs têm capacidade para incorporar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, no entanto, devido à natureza lipídica da matriz, são particularmente adequadas para veicular compostos ativos apolares (Muller *et al.*, 2000). Estas formulações foram desenvolvidas como um sistema alternativo aos lipossomas, emulsões e NPs poliméricas (Muller *et al.*, 2000). Apresentam uma estabilidade a longo prazo e uma eficiência de encapsulação superiores aos lipossomas e, ao contrário da maioria das NPs poliméricas, não são necessários solventes orgânicos potencialmente tóxicos e podem

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

ser produzidos em larga escala com baixo custo e procedimentos relativamente simples (Shidhaye *et al.*, 2008).

Estes sistemas foram já testados para várias vias de administração, a via oral (Rawat *et al.*, 2011), parenteral (Nayak *et al.*, 2010) e a local (Zhang e Smith, 2011; Souto *et al.* 2004) devido ao seu tamanho reduzido e por terem elevada compatibilidade fisiológica (Araújo *et al.*, 2010).

Relativamente às potenciais desvantagens estão relacionadas com a fraca capacidade de encapsulação, a presença de estruturas coloidais alternativas (micelas, lipossomas, nanocristais dos fármacos) na dispersão aquosa, a complexidade do estado físico do lípido o que pode provocar problemas de estabilidade durante o armazenamento ou administração, como por exemplo, congelamento, aumento do tamanho de partícula, expulsão do fármaco (Mukherjee *et al.*, 2009). A capacidade de encapsulação é limitada pela solubilidade do fármaco no lípido fundido, pela estrutura e pelo estado polimérico da matriz lipídica (Mukherjee *et al.*, 2009).

### **3.5.1 VEICULAÇÃO PASSIVA**

#### **3.5.1.1 VIA ORAL**

Pandey *et al.* (2005) incorporaram a RIF, a INH e a PZA em SLNs e a sua eficácia foi avaliada em ratinhos infetados com TB. As eficiências de encapsulação foram de  $51 \pm 5\%$ ,  $45 \pm 4\%$ , e  $41 \pm 4\%$  para a RIF, INH e PZA, respetivamente. As concentrações terapêuticas dos fármacos mantiveram-se no plasma, durante 8 dias e nos órgãos (pulmões, fígado e baço) por 10 dias, após uma única administração oral da formulação em ratinhos, mas os fármacos não formulados foram eliminados em apenas 1-2 dias. Nos ratinhos infetados pelo *M. tuberculosis* H37Rv, 5 doses orais (espaçadas por 10 dias) das SLNs com os fármacos integrados, foram suficientes para eliminar a carga bacteriana nos pulmões e baço, enquanto que foram necessárias 46 doses orais (uma dose diária) dos compostos não encapsulados, para um benefício terapêutico equivalente.

### **3.5.1.2 VIA PULMONAR**

O mesmo grupo de investigação avaliou o potencial quimioterapêutico das SLNs com os mesmos fármacos (RIF, INH e PZA), mas administradas por nebulização a cobaias infetadas com TB. As SLNs obtidas apresentaram um MMAD adequado para o transporte broncoalveolar dos fármacos. Com uma única nebulização, as concentrações terapêuticas foram mantidas no plasma, durante 5 dias e nos órgãos (pulmão, fígado e baço), por 7 dias, mas os fármacos livres foram eliminados após 1-2 dias. O tempo de residência médio e a BD relativa e absoluta dos fármacos foram superiores com a formulação desenvolvida. Nos animais infetados pelo *M. tuberculosis* ao administrar o sistema por nebulização (a cada 7 dias, totalizando 7 doses) não foram mais detetados bacilos tuberculosos nos pulmões nem no baço, mas foram necessárias 46 doses (uma por dia) dos fármacos administrados pela via oral, para um efeito terapêutico equivalente. Além disso, não houve qualquer evidência de hepatotoxicidade (Pandey e Khuller, 2005b).

### **3.5.2 VEICULAÇÃO ATIVA**

#### **3.5.2.1 VIA PARENTERAL**

Recentemente, SLNs foram conjugadas com manose para a veiculação seletiva da RFB para os MAs. Os estudos *ex vitro* mostraram que as NPs manosiladas aumentaram em quase seis vezes, a incorporação pelos MAs e o sistema conjugado foi menos imunogénico e mais adequado para a libertação prolongada, relativamente às SLNs não manosiladas. Além disso, as concentrações no soro e a distribuição nos órgãos demonstraram a sua eficiência para a prolongar o tempo em circulação e para o transporte direcionado da RFB para o tecido alveolar comparando com SLNs não conjugadas (Nimje *et al.*, 2009).

## 4. CONCLUSÃO

De acordo com os relatórios da OMS, a tuberculose é atualmente uma grave ameaça à saúde global, principalmente nos países subdesenvolvidos, estimando-se que a nível mundial, cerca de 1.4 milhões de pessoas tenham sucumbido à doença no ano de 2010 e que 1/3 da população esteja infetada pelo *Mycobacterium tuberculosis* latente.

O tratamento convencional da tuberculose não resistente aos fármacos é altamente eficaz e consiste em 2 meses de terapia intensiva com isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, seguidos de um período mínimo de 4 meses, apenas com isoniazida e rifampicina. Contudo, por vários fatores como o longo período de terapia, com frequência de administração diária e doses elevadas que podem conduzir a vários efeitos adversos e também pelo custo, a adesão dos pacientes a este regime é baixa. Consequentemente, a doença poderá tornar-se difícil de tratar no caso de haver desenvolvimento de estirpes multirresistentes e extensivamente resistentes aos fármacos.

Os investigadores trabalham arduamente no sentido de conceber novas moléculas mais eficazes e específicas para os macrófagos alveolares, o principal local onde se alojam os bacilos, mas apesar de todos os esforços há várias décadas que nenhum medicamento entra no mercado. Como tal, têm sido tentadas novas abordagens, recorrendo aos fármacos já em uso, incorporados em novos sistemas terapêuticos, como os lipossomas, niossomas, micro e nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas, administrados por várias vias.

Muitos dos estudos já realizados tanto *in vitro* como em animais e alguns deles, abordados neste trabalho, atestam a elevada potencialidade destas formulações, por permitirem o direcionamento dos fármacos para os locais infetados e a sua libertação de modo prolongado, verificando-se a redução da carga bacteriana ou até mesmo a eliminação das bactérias dos órgãos que contêm macrófagos, como o baço, fígado e os pulmões, com recurso a frequências de administração mais reduzidas e, em alguns casos com doses inferiores, comparativamente aos agentes terapêuticos não formulados. Além disso, a toxicidade induzida pelos agentes terapêuticos é substancialmente menor ou até mesmo indetetável com os novos sistemas. Estes progressos irão permitir com certeza um maior envolvimento dos doentes no tratamento, aumentando as taxas de cura e reduzindo o aparecimento de resistência.

Uma vez que a transmissão do bacilo é realizada pela via inalatória e o pulmão é o principal local de infeção, é de todo o interesse avaliar a viabilidade de sistemas inaláveis, de modo a conseguir-se um efeito direto nos macrófagos alveolares, aumentando ainda mais

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

a eficácia do tratamento e a redução dos efeitos adversos, comparativamente às vias convencionais (oral e parenteral). Contudo, apesar das vantagens óbvias da via pulmonar e dos resultados promissores, há que ter em conta que os excipientes a usar para a inalação têm de ser totalmente biodegradáveis e biocompatíveis, devido à extrema sensibilidade dos pulmões, mas até agora, poucos trabalhos foram realizados para avaliar os efeitos que poderão ter essas substâncias quando aplicadas durante um período de tempo prolongado nos órgãos humanos saudáveis e, muito menos, nos doentes.

Com o intuito de aumentar ainda mais a especificidade para os macrófagos alveolares, alguns autores apostam na conjugação de ligandos específicos à superfície dos transportadores (veiculação específica), como por exemplo, a *O*-estearoil amilopectina e a albumina de soro bovino maleilada ligada a lipossomas. Deste modo, conseguiu-se um maior direcionamento para o alvo e uma maior internalização dos fármacos. Esta abordagem, futuramente poderá tornar-se mais importante, se forem descobertos novos recetores que existam exclusivamente nos pulmões e o posterior desenho de fármacos específicos para os mesmos.

No entanto, é de extrema importância fazer referência ao facto, de que os trabalhos apresentados foram realizados principalmente em ratos e ratinhos e, uma vez que este modelo não mimetiza muitos dos aspetos da doença humana é necessário muita cautela na interpretação dos resultados.

Por outro lado, independentemente dos benefícios que poderão advir dos novos sistemas terapêuticos, há que ter em consideração que a tuberculose é um problema sobretudo dos países pobres, onde os recursos sociais e económicos escasseiam. Como o desenvolvimento e posteriormente a produção em larga escala envolvem elevados custos, o fator monetário poderá por em causa a sua viabilidade.

## 5. BIBLIOGRAFIA

Adams L.B., Sinha I., Franzblau S.G., Krahenbuhl J.L., Mehta R.T. (1999) **Effective treatment of acute and chronic murine tuberculosis with liposome-encapsulated clofazimine.** *Antimicrob Agents Chemother* 43:1638-1643.

Agrawal A.K., Gupta C.M. (2000) **Tufts-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections.** *Adv Drug Deliver Rev* 41:135-146.

Agarwal A., Kandpal H., Gupta H.P., Singh N.B., Gupta C.M. (1994) **Tufts-bearing liposomes as rifampin vehicles in treatment of tuberculosis in mice.** *Antimicrob Agents Chemother* 38:588-593.

Ahmad Z., Khuller G.K. (2008) **Alginate-based sustained release drug delivery systems for tuberculosis.** *Expert Opin Drug Deliv* 5:1323-1334.

Ahmad Z., Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. (2006a) **Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potencial.** *Indian J Chest Dis Allied Sci* 48:171-176.

Ahmad Z., Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. (2006b) **The potential of azole antifungals against latent/ persistent tuberculosis.** *FEMS Microbiol Lett* 258:200-203.

Ahmad Z., Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. (2006c) **Azole antifungals as novel chemotherapeutic agents against murine tuberculosis.** *FEMS Microbiol Lett* 261:181-186.

Ahmad Z., Sharma S., Khuller G.K. (2005a) **In vitro and ex vivo antimycobacterial potential of azole drugs against M. tuberculosis H37RV.** *FEMS Microbiol Lett* 251:19-22.

Ahmad Z., Sharma S., Khuller G.K. (2005b) **Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis.** *Int J Antimicrob Agents* 26:298-303.

Ahmad Z., Sharma S., Khuller G.K. (2007) **Chemotherapeutic evaluation of alginate nanoparticle-encapsulated azole antifungal and antitubercular drugs against murine tuberculosis.** *Nanomedicine* 3:239-243.

Ahsan F., Rivas I.P., Khan M.A., Suarez A.I. (2002) **Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages.** *J Control Release* 79:29-40.

Ain Q., Sharma S., Garg S.K., Khuller G.K. (2002) **Role of poly [DL-lactide-co-glycolide] in development of a sustained oral delivery system for antitubercular drug(s).** *Int J Pharm* 239:37-46.

- Ain Q., Sharma S., Khuller G.K. (2003a) **Chemotherapeutic potential of orally administered poly(lactide-co-glycolide) microparticles containing isoniazid, rifampin, and pyrazinamide against experimental tuberculosis.** *Antimicrob Agents Chemother* 47:3005-3007.
- Ain Q., Sharma S., Khuller G.K., Garg S.K. (2003b) **Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects.** *J Antimicrob Chemother* 51:931-938.
- Andersen P., Doherty T.M. (2005) **The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine.** *Nat Rev Microbio* 3:656-662.
- Anderson S.T., Williams A.J., Brown J.R., Newton S.M., Simsova M., Nicol M.P., Sebo P., Levin M., Wilkinson R.J., Wilkinson K.A. (2006) **Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* undetected by tuberculin skin testing.** *Am J Respir Crit Care Med* 173:1038-1042.
- Araújo J., Gonzalez-Mira E., Egea M.A., Garcia M.L., Souto E.B. (2010) **Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications.** *Int J Pharm* 393:167-175.
- Araújo J., Veja V., Lopes C.M., Egea M.A., García M.L., Souto E.B. (2009) **Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres.** *Colloid Surf B Biointerfaces* 72:48-56.
- Asane GS., Nirmal S.A., Rasal K.B., Naik A.A., Mahadik M.S., Rao Y.M. (2008) **Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status.** *Drug Dev Ind Pharm* 34:1246-1266.
- Atyabi F., Farkhondehfai A., Esmaeili F., Dinarvand R. (2009) **Preparation of pegylated nano-liposomal formulation containing SN-38: *in vitro* characterization and *in vivo* biodistribution in mice.** *Acta Pharm* 59:133-144.
- Balen G.P., Martinet C.M., Caron G., Bouchard G., Reist M., Carrupt P.A., Fruttero R., Gasco A., Testa B. (2004) **Liposome/water lipophilicity: methods, information content, and pharmaceutical applications.** *Med Res Rev* 24:299-324.
- Bandyopadhyay P., Johnson M. (2007) **Fatty alcohols or fatty acids as niosomal hybrid carrier: effect on vesicle size, encapsulation efficiency and *in vitro* dye release.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 58:68-71.
- Bansil R., Turner B.S. (2006) **Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications.** *Curr Opin Colloid Interf Sci* 11:164-170.
- Barrow E.L., Winchester G.A., Staas J.K., Quenelle D.C., Barrow W.W. (1998) **Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampin to *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages.** *Antimicrob Agents Chemother* 42:2682-2689.

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Beck-Broichsitter M., Schmehl T., Seeger W., Gessler T. (2011) **Evaluating the Controlled Release Properties of Inhaled Nanoparticles Using Isolated, Perfused, and Ventilated Lung Models.** *J Nanomater* 2011 AA-AA.

Bento J., Silva A. S., Rodrigues F., Duarte R. (2011) **Métodos diagnósticos em tuberculose.** *Acta Med Port* 24:145-154.

Berger W. (2009) **Aerosol devices and asthma therapy.** *Curr Drug Deliv* 6:38-49.

Bhardwaj A., Kumar L., Veenu (2011) **Colloidal drug delivery systems: a future prospective for treatment of tuberculosis.** *Am J PharmTech Res* 2011:102-123.

Biju S.S., Talegaonkar S., Misra P.R., Khar R.K. (2006) **Vesicular systems: Na overview.** *Indian J Pharm Sci* 68:141-153.

Biswal S., Murthy P.N., Sahu J., Sahoo P., Amir F. (2008) **Vesicles of Non-ionic Surfactants (Niosomes) and Drug Delivery Potential.** *Int J Pharm Sci Nanotechnology* 1:1-10.

Blazek-Walsh A.I., Rhodes D.G. (2001) **SEM imaging predicts quality of niosomes from maltodextrin-based proniosomes.** *Pharm Res* 18:656-661.

Bombarda S., Figueiredo C.M., Funari M.B.G., Júnior J.S., Seiscento M., Filho M.T.(2001) **Imagem em tuberculose pulmonar.** *J Pneumol* 27:329-340

Brennan P.J., Nikaido H. (1995) **The envelope of mycobacteria.** *Annu Rev-Biochem* 64:29-63.

Briones E., Colino C.I., Lanao J.M. (2008) **Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells.** *J Control Release* 125:210–227.

Brosch R., Gordon S.V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons L.M., Pym A.S., Samper S., van Soolingen D., Cole S.T. (2002) **A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3684–3689.

Burgess D.J., Hickey A.J. (1994) **Microsphere technology and applications.** *In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* Swarbrick J, Boylan J.C., Eds. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel. 10:1-29.

Burgess L.J., Maritz F.J., Le Roux I., Taljaard J.J. (1996) **Combined use of pleural adenosine deaminase with lymphocyte/ neutrophil ratio: increased specificity for the diagnosis of tuberculous pleuritis.** *Chest* 109:414-419.

Burman W.J. (2005) **Issues in the management of HIV-related tuberculosis.** *Clin Chest Med* 26:283–294.

Campos H.S. (2006) **Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas.** *Pulmão* 15:29-35.

Cantor J.O., Turino G.M. (2004) **Can exogenously administered hyaluronan improve respiratory function in patients with pulmonary emphysema?** *Chest* 125:288-292.

Capone D., Jansen J.M., Lopes A.J., Sant'Anna C.C., Soares M.O., Pinto R.S., Siqueira H.R., Marchiori E., Capone R.B. (2006) **Diagnóstico por imagem da tuberculose pulmonar.** *Pulmão RJ* 15:166-174.

Cardona P.J. (2006) **RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection.** *Tuberculosis* 86:273-289.

Carvalho W.S., Miranda S.S., Pesquero J.L., Gomes M.A. (2007) **Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase.** *Braz J Pharm Sci* 43:31-38.

Chaisson R.E., Martinson N.A. (2008) **Tuberculosis in Africa- Combating an HIV-Driven Crisis.** *NEJM* 358:1089-1092.

Chakroborty A. (2011) **Drug-resistant tuberculosis: an insurmountable epidemic?** *Inflammopharmacol* 19:131-137.

Chandu V.P., Arunachalam A., Jeganath S., Yamini K., Tharangini K., Chaitanya G. (2012) **Niosomes: a novel drug delivery system.** *Int J Novel Tr Pharm Sci* 2:498-511.

Chang K.C., Leung C.C., Yew W.W., Tam C.M. (2008) **Supervised and induced sputum among patients with smear-negative pulmonary tuberculosis.** *Eur Respir J* 31:1085-1090.

Chiang C-Y., Yew W.W. (2009) **Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis.** *Int J Tuberc Lung Dis* 13:304-311.

Chimote G., Banerjee R. (2005) **Effect of antitubercular drugs on dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers: Implications for drug loaded surfactants.** *Respir Physiol Neurobiol* 145:65-77.

Chimote G., Banerjee R. (2009) **Evaluation of antitubercular drug-loaded surfactants as inhalable drug-delivery systems for pulmonary tuberculosis.** *J Biomed Mater Res A* 89:281-292.

Chimote G., Banerjee R. (2010) **In vitro evaluation of inhalable isoniazid-loaded surfactant liposomes as an adjunct therapy in pulmonary tuberculosis.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 94:1-10.

Chono S., Tanino T., Seki T., Morimoto K. (2006) **Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes.** *J Drug Target* 14:557-566.

Chono S., Tanino T., Seki T., Morimoto K. (2008) **Efficient drug targeting to rat alveolar macrophages by pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into mannosylated liposomes for treatment of respiratory intracellular parasitic infections.** *J Controlled Rel* 127:50-58.

Christoforidis J.B., Chang S., Jiang A., Wang J., Cebulla C.M. (2012) **Intravitreal Devices for the Treatment of Vitreous Inflammation.** *Mediators Inflamm* 2012:AA-AA.

Clark-Curtiss J.E., Haydel S.E. (2003) **Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis.** *Annu Rev Microbiol* 57:517–549.

Clark M.A., Hirst B.H., Jepson M.A. (2000) **Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles.** *Adv Drug Deliv Rev* 43:207–223.

Colditz G.A., Berkey C.S., Mosteller F., Brewer T.F., Wilson M.E., Burdick E., Fineberg H.V. (1995) **The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature.** *Pediatrics* 96:29-35.

Conte J.E. Jr, Golden J.A., McQuitty M., Kipps J., Lin E.T., Zurlinden E. (2000) **Single-dose intrapulmonary pharmacokinetics of rifapentine in normal subjects.** *Antimicrob Agents Chemother* 44:985–990.

Couvreur P., Fattal E., Andremont A. (1991) **Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections.** *Pharm Res* 8:1079-1786.

Cox J.C., Coulter A.R. (1997). **Adjuvants – a classification and review of their modes of action.** *Vaccine* 15:248–256.

Creuwels L.A., Van Golde L.M., Haagsman H. P. (1997) **The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects.** *Lung* 175:1–39.

Crevel R.V, Ottenhoff T.H., van der Meer J.W. (2002) **Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*.** *Clin Microbiol Rev* 15:294-309.

Davis J.M., Ramakrishnan L. (2009) **The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection.** *Cell* 136:37–49.

Dean A.S. (2007) **Liposomal drug delivery.** *J Infus Nurs* 30:89–95.

Deol P., Khuller K.G. (1997) **Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs in mice.** *Biochem Biophys Acta* 1334:161-172.

Dheda K., Booth H., Huggett J.F., Johnson M.A., Zumla A., Rook G.A. (2005) **Lung remodeling in pulmonary tuberculosis.** *J Infect Dis* 192:1201-1210.

Dhillon J., Fielding R., Adler-Moore J., Goodael R.L., Mitchison D. (2001) **The activity of low-clearance liposomal amikacin in experimental murine tuberculosis.** *J Antimicrob Chemoth* 48:869–876.

Direcção-Geral da Saúde (2007) **Circular Informativa: Utilização dos testes de Interferão-Gama para o diagnóstico da tuberculose latente e activa, na prática clínica.** N° 6/DT.

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Direcção-Geral da Saúde (2012) **Ponto da situação Epidemiológica e de desempenho (Stop TB 2012)**. *Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose* 1-17.

Dolovich M.A. (2000) **Influence of inspiratory flow rate, particle size, and airway caliber on aerolized drug delivery to the lung**. *Respir Care* 45:597-608.

Donald P.R., Sirgel F.A., Venter A., Smit E., Parkin D.P., Van de Wal B.W., Mitchison D.A. (2001) **The early bactericidal activity of a low-clearance liposomal amikacin in pulmonary tuberculosis**. *J Antimicrob Chemother* 48:877-880.

Dorman S.E., Chaisson R.E. (2007) **From magic bullets back to the Magic Mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis**. *Nat Med* 13:295–298.

Duarte R., Amado J., Lucas H., Sapage, J.M. (2007) **Tratamento da tuberculose latente: Revisão das normas, 2006**. *Rev Port Pneumol* [online]. 13:397-418.

Dube D., Agrawal G.P., Vyas S.P. (2012) **Tuberculosis: from molecular pathogenesis to effective drug carrier design**. *Drug Discov Today* 17:760-773.

Ducati R.G., Ruffino-Netto A., Basso L.A., D.S. Santos (2006) **The resumption of consumption. A review on tuberculosis** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:697-714.

Dutt M., Khuller G.K. (2001a) **Sustained release of isoniazid from a single injectable dose of poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles as a therapeutic approach towards tuberculosis**. *Int J Antimicrob Agents* 17:115-122.

Dutt M., Khuller G.K. (2001b) **Chemotherapy of Mycobacterium tuberculosis infections in mice with a combination of isoniazid and rifampicin entrapped in Poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles**. *J Antimicrob Chemother* 47:829-835.

Edwards D., Kirkpatrick C.H. (1986) **The immunology of mycobacterial diseases**. *Am Rev Respir Dis* 134:1062-1071.

Edwards K.A., Baeumner A.J. (2006) **Liposomes in analyses**. *Talanta* 68:1432-1441.

Ehrhardt M., Laue M., Kim K.J. (2008) **In vitro models of the alveolar epithelial barrier**. In: **Biotechnology Pharmaceutical Aspects VII**. Erhardt C., Kim K.J., Eds. *Drug Absorption Studies* 258–282. Springer, Berlin, Germany.

Ekambaram P., Sathali A.A., Priyanka K. (2012) **Solid lipid nanoparticles: a review**. *Sci Revs Chem Commun* 2:80-102.

El-Ridy M.S., Abdelbary A., Nasr E.A., Khalil R.M., Mostafa D.M., El-Batal A.I., Abd El-Alim S.H. (2011) **Niosomal encapsulation of the antitubercular drug, pyrazinamide**. *Drug Dev Ind Pharm* 37:1110-1118.

El-Sadr W.M., Tsiouris S.J. (2008) **HIV-associated tuberculosis: diagnostic and treatment challenges**. *Semin Respir Crit Care Med* 29: 525–531.

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Evans C.M., Koo J.A. (2009) **Airway mucus: the good, the bad, the sticky.** *Pharmacol Ther* 121:332–348.

Fang J.Y., Hwang T.L., Huang Y.L. (2006) **Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes.** *Curr Nanosci* 2:55–70.

Fehrenbach H. (2001) **Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited.** *Respir Res* 2: 33–46.

Fernandes C.A., Vanbever R. (2009) **Preclinical models for pulmonary drug delivery** *Expert Opin Drug Deliv* 11:1231-1245.

Fielding R.M., Lasic D.D. (1999) **Liposomes in the treatment of infectious diseases.** *Exp Opin Ther Patents* 9:1679-1688.

Fielding R.M., Lewis R.O., Moon-McDermott L. (1998) **Altered tissue distribution and elimination of amikacin encapsulated in unilamellar, low-clearance liposomes (MiKasome).** *Pharm Res* 15:1775-1781.

Figueiredo R., Moiteiro C., Medeiros M.A., da Silva P.A., Ramos D., Spies F., Ribeiro M.O., Lourenço M.C., Júnior I.N., Gaspar M.M., Cruz M.E., Curto M.J., Franzblau S.G., Orozco H., Aguilar D., Hernandez-Pando R., Costa M.C. (2009). **Synthesis and evaluation of rifabutin analogs against *Mycobacterium avium* and H37Rv, MDR, and NRP *Mycobacterium tuberculosis*.** *Bioorg Med Chem* 17:503–511.

Fink J.B. (2000) **Metered-dose inhalers, dry powder inhalers, and transitions.** *Respir Care* 45:623-635.

Flynn J.L., Chan J. (2001) **Tuberculosis: latency and reactivation.** *Infect Immun* 69: 4195–4201.

Frézard F. (1999) **Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines.** *Braz J Med Biol Res* 32:181-189.

Frieden T.R., Sterling T.R., Munsiff S.S., Watt C.J., Dye C. (2003) **Tuberculosis.** *Lancet* 362:887–899.

Fux C.A., Shirtliff M., Stoodley P., Costerton J.W. (2005) **Can laboratory reference strains mirror “real-world” pathogenesis?** *Trends Microbiol* 13:58–63.

Gandy M., Zumla A. (2002) **The resurgence of disease: social and historical perspectives on the 'new' tuberculosis.** *Soc Sci Med* 55:385-396.

Garcia-Contreras L., Sethuraman V., Kazantseva M., Godfrey V., Hickey A.J. (2006) **Evaluation of dosing regimen of respirable rifampicin biodegradable microspheres in the treatment of tuberculosis in the guinea pig.** *J Antimicrob Chemother* 58:980–986.

Gasco M.R. (1993) Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, *US Patent* 5 250 236.

Gaspar M.M., Cruz A., Fraga A.G., Castro A.G., Cruz M.E., Pedrosa J. (2008a) **Developments on Drug Delivery Systems for the Treatment of Mycobacterial Infections.** *Curr Top Med Chem* 8:579-591.

Gaspar M.M., Cruz A., Penha A.F., Reymão J., Sousa A.C., Eleutério C.V., Domingues S.A., Fraga A.G., Longatto Filho A., Cruz M.E.M., Pedrosa J. (2008b) **Rifabutin encapsulated in liposomes exhibits increased therapeutic activity in a model of disseminated tuberculosis.** *Int J Antimicrob Agents* 31:37-45.

Gelperina S., Kisich K., Iseman M.D., Heifets L. (2005) **The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis.** *Am J Resp Crit Care Med* 172:1487-1490.

Gilbert B.E. (1996) **Liposomal aerosols in the management of pulmonary infections.** *J Aerosol Med* 9:111-122.

Glickman M.S, Jacobs Jr W.R. (2001) **Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline.** *Cell* 104:477-485.

Goerke J. (1998) **Pulmonary surfactant: functions and molecular composition.** *Biochim Biophys Acta* 1408:79-89.

Goldrick B.A. (2004) **Once dismissed, still rampant: tuberculosis, the second deadliest infectious disease worldwide.** *Am J Nurs* 104:68-70.

Grislain L., Couvreur P., Lenaerts V., Roland M., Deprez-Decampeneere D., Speiser P. (1983) **Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier.** *Int J Pharm* 15:335-345.

Guardiola-Diaz H.M., Foster L.A., Mushrush D., Vaz A.N. (2001) **Azoleantifungal binding to a novel cytochrome P450 from *Mycobacterium tuberculosis*.** *Biochem Pharmacol* 61:1463-1470.

Gumbleton M. (2001) **Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium.** *Adv Drug Deliv Rev* 49:281-300.

Hari B.N., Chitra K.P., Bhimavarapu R., Karunakaran P., Muthukrishnan N., Rani B. (2010) **Novel technologies: A weapon against tuberculosis.** *Indian J Pharmacol* 42:338-344.

Hattori Y., Kawakami S., Nakamura K., Yamashita F., Hashida M. (2006) **Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by *in vivo* gene delivery with mannosylated lipoplex via the intraperitoneal route.** *J Pharmacol Exp Ther* 318: 828-834.

Haydel S.E (2010) **Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: A Sign of t times and an impetus for antimicrobial discovery.** *Pharmaceuticals* 3:2268-2290.

Hirota K., Hasegawa T., Hinata H., Ito F., Inagawa H., Kochi C., Soma G., Makino K., Terada H. (2007) **Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded PLGA microspheres by alveolar macrophages.** *J Control Release* 119:69-76.

Hirota K., Hasegawa T., Nakajima T., Inagawa H., Kohchi C., Soma G.-I., Makino K., Terada H. (2010) **Delivery of rifampicin-PLGA microspheres into alveolar macrophages is promising for treatment of tuberculosis.** *J Control Release* 142:339-346.

Hukkanen J., Pelkonen O., Hakkola J., Raunio H. (2002) **Expression and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Lung.** *Crit Rev Toxicol* 32:391-411.

Hwang S.M., Kim D.D., Chung S.J., Shim C.K. (2008) **Delivery of ofloxacin to the lung and alveolar macrophages via hyaluronan microspheres for the treatment of tuberculosis.** *J Control Release* 129:100-106.

Imbuluzqueta E., Gamazo C., Ariza J., Blanco-Prieto M.J. (2010) **Drug delivery systems for potential treatment of intracellular bacterial infections.** *Frontiers in Bioscience* 15:397-417.

Irache J.M., Salman H.H., Gamazo C., Espuelas S. (2008) **Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics.** *Expert Opin Drug Deliv* 5:703-724.

Jacobs C., Müller R.H. (2002) **Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration.** *Pharm Res* 19:189-194.

Jain C.P., Vyas S.P. (1995) **Preparation and characterization of niosomes containing rifampicin for lung targeting.** *J Microencapsul* 12:401-407.

Jain C.P., Vyas S.P., Dixit V.K. (2006) **Niosomal system for delivery of rifampicin to lymphatics.** *Indian J Pharm Sci* 68:575-578.

Jain K.K. (2008) **Drug delivery systems - an overview.** *Methods Mol Biol* 437:1-50.

Jain R.A. (2000) **The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices.** *Biomaterials* 21:2475-2490.

Jain S.K., Gupta Y., Ramalingam L., Jain A., Jain A., Khare P., Bhargava D. (2010) **Lactose-Conjugated PLGA Nanoparticles for Enhanced Delivery of Rifampicin to the Lung for Effective Treatment of Pulmonary Tuberculosis.** *J Pharm Sci Technol* 64:278-287.

Jalil R., Nixon J.R. (1990) **Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties** *J Microencapsul* 7:297-325.

Jensen P.A., Lambert L.A., Iademarco M.F., Ridzon R. (2005) **Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings.** *MMWR Recomm Rep* 54:1-141.

Johnson C.M., Pandey R., Sharma S., Khuller G.K., Basaraba R.J., Orme I.M., Lenaerts A.J. (2005) **Oral therapy using nanoparticle-encapsulated antituberculosis drugs in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 49:4335–4338.

Jong B.C., Antonio M., Gagneux S. (2010) ***Mycobacterium africanum*-review of an important cause of human tuberculosis in West Africa.** *PLoS Negl Trop Dis* 4:e744.

Jordão L., Vieira O. V. (2011) **Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease.** *Int J Cell Biol* 2011:AA-AA.

Justo O.R., Moraes A.M. (2003) **Incorporation of antibiotics in liposomes designed for tuberculosis therapy by inhalation.** *Drug Deliv* 10:201–207.

Karki R., Mamatha G.C., Subramanya G., Udupa N. (2008) **Preparation, characterization and tissue disposition of niosomes containing isoniazid.** *Rasayan J Chem* 1: 224-227.

Kas H.S., Oner L. (2000) **Microencapsulation using coacervation/phase separation: an overview of the technique and applications.** In: WISE D.L., Ed. *Handbook of Pharmaceutical controlled release technology.* New York, Marcel-Dekker 301-328.

Kaufmann S.H. (2001) **How can immunology contribute to the control of tuberculosis?** *Nat Rev Immunol* 1:20-30.

Kaur D., Guerin M.E., Škovierová H., Brennan P.J., Jackson M. (2009) ***Mycobacterium tuberculosis*.** *Adv Appl Microbiol* 69:23–78.

Kawakami S., Sato A., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M. (2000) **Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes.** *Gene Ther* 7:292–299.

Kirby C., Gregoriadis G. (1981) **Plasma-induced release of solutes from small unilamellar liposomes is associated with pore formation in the bilayers.** *Biochem J* 199:251-254.

Kisich K.O., Gelperina S.I., Higgins M.P., Wilson S., Shipulo E., Oganessian E, Heifets L.B. (2007) **Encapsulation of moxifloxacin within poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles enhances efficacy against intracellular *Mycobacterium tuberculosis*.** *Int J Pharm* 345:154-162.

Kiyoyama S., Shiomori K., Kawano Y., Hatate Y. (2003) **Preparation of microcapsules and control of their morphology.** *J Microencapsul* 20:497-508.

- Klemens S.P., Cynamon M.H., Swenson C.E., Ginsberg R.S. (1990) **Liposome-encapsulated gentamicin therapy of Mycobacterium avium complex infection in beige mice.** *Antimicrob Agents Chemother* 34:967-970.
- Knechel N.A. (2009) **Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis.** *Crit Care Nurse* 29:34-43.
- Knoch M., Keller M. (2005) **The customised electronic nebuliser: A new category of liquid aerosol drug delivery systems.** *Expert Opin Drug Deliv* 2:377-390.
- Kurmi B.D., Kayat J., Gajbhiye V., Tekade R.K., Jain N.K (2010) **Micro- and nanocarrier-mediated lung targeting.** *Expert Opin Drug Deliv* 7:781-794.
- Kumar A., Glaum M., El-Badri N., Mohapatra S., Haller E., Park S., Patrick L., Nattkemper L., Vo D., Cameron D.F. (2011) **Initial Observations of Cell-Mediated Drug Delivery to the Deep Lung.** *Cell Transplant* 20:609-618.
- Labana S., Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. (2002) **Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes.** *Int J Antimicrob Agents* 20:301-304.
- Labiris N.R., Dolovich M.B. (2003) **Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications.** *J Clin Pharmacol* 56:588-599.
- Lansley A.B. (1993) **Mucociliary clearance and drug delivery via the respiratory tract.** *Adv Drug Deliv Rev* 11:299-327.
- Lasic D.D. (1990) **On the thermodynamic stability of liposomes.** *J Colloid Interface Sci* 140:302-304.
- Lasic D.D. (1998) **Novel applications of liposomes.** *Trends Biotechnol* 16:307-321.
- Le Conte P., Le Gallou F., Potel G., Struillou L., Baron D., Drugeon H.B. (1994) **Pharmacokinetics, toxicity, and efficacy of liposomal capreomycin in disseminated Mycobacterium avium beige mouse model.** *Antimicrob Agents Chemother* 38:2695-2701.
- Li S.D., Huang L. (2010) **Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting.** *J Control Release* 145:178-181.
- Lienhardt C., Vernon A., Raviglione M.C. (2010) **New drugs and new regimens for the treatment of tuberculosis: review of the drug development pipeline and implications for national programmes.** *Curr Opin Pulm Med* 16:186-193.
- Lin M.Y., Ottenhoff T.H. (2008) **Host-pathogen interactions in latent Mycobacterium tuberculosis infection: identification of new targets for tuberculosis intervention.** *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8:15-29.

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Lindhard T.R. (1998) **Biodegradable polymers for controlled release of drugs**. New York, Springer-Verlag p.410.

Ling D.I., Flores L.L., Riley L.W., Pai M. (2008) **Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression**. *PLoS ONE* 3:e1536.

Lipworth B.J. (2000) **Targets for inhaled treatment**. *Respir Med* 94 Suppl. D:S13–S16.

Loddenkemper R., Hauer B. (2010) **Drug-Resistant Tuberculosis**. *Dtsch Arztebl Int* 107:10–19.

Lopez-Marin L.M. (2012) **Nonprotein Structures from Mycobacteria: Emerging Actors for Tuberculosis Control**. *Clin Dev Immunol* 2012:AA-AA.

Machado L.C., Gnoatto S.A., Klüppel M.L. (2007) **Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura**. *Estud Biol* 29:215-224.

Madhav N.V., Saini A. (2011) **Niosomes: a novel drug delivery system**. *Int J Res Pharmacy Chem* 1:498-511.

Malam Y., Loizidou M., Seifalian A.M. (2009) **Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer**. *Trends Pharmacol Sci* 30:592–599.

Manual Merck: <http://www.manualmerck.net/> (consultado a 12/11/2012).

Mariani F., Goletti D., Ciaramella A., Martino A., Colizzi V., Fraziano M. (2001) **Macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* during HIV infection relationships between macrophage activation and apoptosis**. *Curr Mol Med* 1:209-216.

Marriner G.A., Nayyar A., Uh E., Wong S.Y., Mukherjee T., Via L.E., Carroll M., Edwards R.L., Gruber T.D., Choi I., Lee J., Arora K, Kathleen D. England K.D., Boshoff H.I.M., Barry III C.E. (2011) **The Medicinal Chemistry of Tuberculosis Chemotherapy**. *Top Med Chem* 7: 47–124.

Martins S., Sarmiento B., Ferreira D.C., Souto E.B (2007) **Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles**. *Int J Nanomedicine* 2:595–607.

Martire T.M. (2009) **Diagnóstico laboratorial da tuberculose na infância: métodos convencionais e métodos rápidos**. *Pulmao RJ Supl* 1:20-S27.

McGreal E.P., Martinez-Pomares L., Gordon S. (2004) **Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system**. *Mol Immunol* 41:1109–1121.

McMurray D.N., Collins F.M., Dannenberg Jr A.M., Smith D.W. (1996) **Pathogenesis of experimental tuberculosis in animal models**. *Curr Top Microbiol Immunol* 215:157-179.

McShane H., Pathan A.A., Sander C.R., Keating S.M., Gilbert S.C., Huygen K., Fletcher H.A., Hill A.V. (2004) **Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans.** *Nat Med* 10:1240-1244.

Medipedia: <http://www.medipedia.pt> (acedido em 12/11/2012).

Mehnert W., Mäder K. (2001) **Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications.** *Adv Drug Deliver Rev* 47:165–196.

Michos A.G., Daikos G.L., Tzanetou K., Theodoridou M., Moschovi M., Nicolaidou P., Petrikos G., Syriopoulos T., Kanavaki S., Syriopoulou V.P. (2006) **Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in respiratory and nonrespiratory specimens by the Amplicor MTB PCR.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 54:121-126.

Misra A., Hickey A.J., Rossi C., Borchard G., Terada H., Makino K., Fourie P.B., Colombo P. (2011) **Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis.** *Tuberculosis* 91:71-81.

Mo Y., Lim L. (2004) **Mechanistic Study of the Uptake of Wheat Germ Agglutinin-Conjugated PLGA Nanoparticles by A549 Cells.** *J Pharm Biomed Sci* 93:20-28.

Mohanraj V.J., Chen Y. (2006) **Nanoparticles – A Review.** *Trop J Pharm Res* 5:561-573.

Mufamadi M.S., Pillay V., Choonara Y.E., du Toit G., Modi L.C., Naidoo D., Ndesendo V.M. (2011) **A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery.** *J Drug Deliv* 2011:AA-AA.

zur Muhlen A., Schwarz C., Mehnert W. (1998) **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-drug release and release mechanism.** *Eur J Pharm Biopharm* 45:149–155.

Mukherjee S., Ray S., Thakur R.S. (2009) **Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System.** *Indian J Pharm Sci* 71:349–358.

Mukherjee J.S., Rich M.L., Socci A.R., Joseph J.K., Virú F.A., Shin, S.S. Furin, J.J. Becerra M.C., Barry D.J., Kim, J.Y., Bayona J., Farmer P., Smith Fawzi M.C., Seung K.J. (2004) **Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis.** *Lancet* 363:474–481.

Mukhopadhyay A., Basu S.K. (2003) **Intracellular delivery of drugs to macrophages.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 84:183–209.

Muller R.H., Mader K., Gohla S. (2000) **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art.** *Eur J Pharm Biopharm.* 50:161–177.

Muller R.H., Wallis K.H. (1993) **Surface modification of i.v. injectable biodegradable nanoparticles with poloxamer polymers and poloxamine 908.** *Int J Pharm* 89:25-31.

Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. (2005) **Medical Microbiology.** Elsevier, 5 th ed.

Muller R.H., Lucks J.S. (1996) **Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen—feste Lipid Nanosphären (SLN).** *European Patent* No. 0605497.

Muttill P., Kaur J., Kumar K., Yadav A.B., Sharma R., Misra A. (2007) **Inhalable microparticles containing large payload of anti-tuberculosis drugs.** *Eur J Pharm Sci* 32:140-150.

Muttill P., Wang C., Hickey A. (2009) **Inhaled drug delivery for tuberculosis therapy.** *Pharm Res* 26:2401-2416.

Mwaba P., McNerney R., Grobusch M.P., O'Grady J., Bates M., Kapata N., Maeurer M., Zumla A. (2011) **Achieving STOP TB Partnership goals: perspectives on development of new diagnostics, drugs and vaccines for tuberculosis.** *Trop Med Int Health* 16:819–827.

Nair L.S., Laurencin C.T. (2007) **Biodegradable polymers as biomaterials.** *Polymers Biomed Appl* 32:762–798.

Nakamura K., Kuramoto Y., Mukai H., Kawakami S., Higuchi Y., Hashida M. (2009) **Enhanced gene transfection in macrophages by histidine-conjugated mannosylated cationic liposomes.** *Biol Pharm Bull* 32:1628–1631.

Nakaoka R., Tabata Y., Ikada Y. (1996) **Adjuvants effect of biodegradable poly(DL-lactic acid) granules capable for antigen release following intraperitoneal injection.** *Vaccine* 4:1671-1676.

Namdeo A., Jain N.K. (1996) **Niosomes as drug carries.** *Indian J Pharm Sci* 58:41-46.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases: <http://www.niaid.nih.gov> (acedido a 24/10/2012).

Nayak A.P., Tiyaboonchai W., Patankar S., Madhusudhan B., Souto E.B. (2010) **Curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: novel approach towards malaria treatment.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 81:263-273.

Nimje N., Agarwal A., Saraogi G.K., Lariya N., Rai G., Agrawal H., Agrawal G.P. (2009) **Mannosylated nanoparticulate carriers of rifabutin for alveolar targeting.** *J Drug Target* 17:777-787.

Nishioka K., Sato P.S., Constantopoulos A., Najjar V.A. (1973) **The chemical synthesis of the phagocytosis-stimulating tetrapeptide tuftsin (Thr-Lys-Pro-Arg) and its biological properties.** *Biochim Biophys Acta* 310:230-237.

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Nuernberger E.L., Spigelman M.K., Yew W.W. (2010) **Current development and future prospects in chemotherapy of tuberculosis.** *Respirology* 15:764–778.

Nunn P., Reid A., De Cock K.M. (2007) **Tuberculosis and HIV infection: the global setting.** *J Infect Dis* 196: 5–14.

Oh Y.K., Nix D.E., Straubinger R.M. (1995) **Formulation and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular *Mycobacterium avium* infection.** *Antimicrob Agents Chemother* 39:2104-2111.

O'Hara P., Hickey A.J. (2000) **Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterisation.** *Pharm Res* 17:955–961.

Oliveira G.P., Zin W.A., Rocco P.R. (2005) **Inhalation systems for asthma: advantages and disadvantages.** *Pulmão RJ* 14:251-257.

Onoue S., Misaka S., Kawabata Y., Yamada S. (2009) **New treatments for chronic obstructive pulmonary disease and viable formulation/device options for inhalation therapy.** *Expert Opin Drug Deliv* 6:793-811.

Onyebujoh P., Zumla A., Ribeiro I., Rustomjee R., Mwaba P., Gomes M., Grange J.M. (2005) **Treatment of tuberculosis: present status and future prospects** *Bull World Health Organ* 83:857-865.

Onyeji C.O., Nightingale C.H., Nicolau D.P., Quintiliani R. (1994a) **Efficacies of liposome-encapsulated clarithromycin and ofloxacin against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in human macrophages.** *Antimicrob Agents Chemother* 38:523-527.

Onyeji C.O., Nightingale C.H., Nicolau D.P., Quintiliani R. (1994b) **Activities of liposome-encapsulated azithromycin and rifabutin compared with that of clarithromycin against *Mycobacterium avium-intracellulare* complex in human macrophages.** *Int J Antimicrob Agents* 4:281-289.

O'Riorden T.G. (2002) **Formulations and nebulizer performance.** *Respir Care* 47:1305–1312.

Orozco L.C., Quintana F.O., Beltran R.M., de Moreno I., Wasserman M., Rodriguez G. (1986) **The use of rifampicin and isoniazida entrapped in liposomes for the treatment of murine tuberculosis.** *Tubercle* 67:91-97.

Owen R., Strasters J., Breyer E.D. (2005) **Lipid vesicles in capillary electrophoretic techniques: characterization of structural properties and associated membrane-molecule interactions.** *Electrophoresis* 26:735–751.

Ozkan Y., Dikmen N., Isimer A., Günhan O., Aboul-Enein H.Y. (2000) **Clarithromycin targeting to lung: characterization, size distribution and in vivo evaluation of the human serum albumin microspheres.** *Farmaco* 55:303-307.

Pai M., Ramsay A., O'Brien R. (2008) **Evidence-based tuberculosis diagnosis**. *PLoS Med* 5:1043-1049.

Palomino J.C. (2005) **Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field**. *Eur Respir J* 26:339-350.

Pandey R., Khuller G.K. (2004a) **Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers**. *J Antimicrob Chemother* 53:635-640.

Pandey R., Khuller G.K. (2004b) **Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model**. *J Antimicrob Chemother* 54:266-268.

Pandey R., Khuller G.K. (2004c) **Polymer based drug delivery systems for mycobacterial infections**. *Curr Drug Deliv* 1:195-201.

Pandey R., Khuller G.K. (2005a) **Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges**. *J Antimicrob Chemother* 55:430-435.

Pandey R., Khuller G.K. (2005b) **Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis**. *Tuberculosis* 85: 227-234.

Pandey R., Khuller G.K. (2006) **Nanotechnology based drug delivery system(s) for the management of tuberculosis**. *Indian J Exp Biol* 44:357-366.

Pandey R., Khuller G.K. (2007) **Nanoparticle-based oral drug delivery system for an injectable antibiotic - streptomycin. Evaluation in a murine tuberculosis model**. *Chemotherapy* 53:437-441.

Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. (2004). **Nebulization of liposome encapsulated antitubercular drugs in guinea pigs**. *Int J Antimicrob Agents* 24:93-94.

Pandey, R., Sharma S., Khuller G.K. (2005) **Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy**. *Tuberculosis* 85:415-420.

Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. (2006a) **Chemotherapeutic efficacy of nanoparticle encapsulated antitubercular drugs**. *Drug Deliv* 13:287-94.

Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. (2006b) **Oral poly(lactide-co-glycolide) nanoparticle based antituberculosis drug delivery: toxicological and chemotherapeutic implications**. *Indian J Exp Biol* 44:459-467.

Pandey R., Sharma A., Zahoor A., Sharma S., Khuller G.K., Prasad B. (2003a) **Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis**. *J Antimicrob Chemother* 52:981-986.

Pandey R., Zahoor A., Sharma S., Khuller G.K. (2003b) **Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis**. *Tuberculosis (Edinb)* 83:373-378.

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Pandolfi J.R., Malaspina A.C., Santos A.C.B., Suffys P.N., Oelmann M.A.C., Valentini S.R., Leite C.Q.F. (2007) **Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia.** *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 28:251-257.

Panyam J., Labhasetwar V. (2003) **Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue.** *Adv Drug Deliv Rev* 55:329-347.

Park J., Ye M., Park K. (2005) **Biodegradable Polymers for Microencapsulation of Drugs.** *Molecules* 10:146-161

Patil J.S., Sarasija S. (2012) **Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic Review.** *Lung India* 29:44-49.

Patton J.S. (1996) **Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs.** *Adv Drug Deliv Rev* 19:3-36.

Patton J.S., Byron P.R. (2007) **Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs.** *Nat Rev Drug Discov* 6:67-74.

Pavala R.N., Suriyaprakash T.N., Senthamarai R. (2010) **Formulation and evaluation of Rifampicin and Gatifloxacin niosomes on logarithmic-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Int J Pharm Bio Sci* 1:435-442.

Pérez-Gil J., Keough K.M. (1998) **Interfacial properties of surfactant proteins.** *Biochim Biophys Acta* 1408:203-217.

Pimentel L.F., Júnior A.T., Mosqueira V.C. (2007) **Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária.** *Rev Bras Cienc Farm* 43:503-514.

Pinheiro M., Lúcio M., Lima J.L., Reis S. (2011) **Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB.** *Nanomedicine* 6:1413-1428.

Piscitelli S.C., Gallicano P.D., Gallicano K.D. (2001) **Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections.** *N Engl J Med* 344:984-996.

Pitarque S., Larrouy-Maumus G., Payré B., Jackson M., Puzo G., Nigou J. (2008) **The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface.** *Tuberculosis (Edinb)* 88:560-565.

Prior S., Gander B., Blarer N., Merkle H.P., Subira M.L., Irache J.M., Gamazo C. (2002) **In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres.** *Eur J Pharm Sci* 15:197-207.

Quenelle D.C., Staas J.K., Winchester G.A., Barrow E.L., Barrow W.W. (1999) **Efficacy of microencapsulated rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice.** *Antimicrob Agents Chemother* 43:1144-1151.

Quenelle D.C., Winchester G.A., Staas J.K., Barrow E.L., Barrow W.W. (2001) **Treatment of tuberculosis using a combination of sustained-release rifampin-**

**loaded microspheres and oral dosing with isoniazid.** *Antimicrob Agents Chemother* 45:1637-1644.

Rao G.C., Kumar M.S., Mathivanan N., Rao M.E. (2004). **Nanosuspensions as the most promising approach in nanoparticulate drug delivery systems.** *Pharmazie* 59: 5–9.

Rau J.L. (2005) **The inhalation of drugs: advantages and problems.** *Respir Care* 50:367-382.

Rausch A., Kortleever C.: <http://humanphysiology2011.wikispaces.com> (acedido a 25/10/2012).

Raviglione M.C., Snider D.E. Jr., Kochi A. (1995) **Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic.** *JAMA*. 273:220-226.

Rawat M.K., Jain A., Singh S. (2011) **In vivo and cytotoxicity evaluation of repaglinide-loaded binary solid lipid nanoparticles after oral administration to rats.** *J Pharm Sci* 100:2406-2417.

Redhead H.M., Davis S.S., Illum L. (2001) **Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation.** *J Control Release* 70:353-363.

Riccardi G., Pasca M.R., Buroni S. (2009) **Mycobacterium tuberculosis: drug resistance and future perspectives.** *Future Microbiol* 4:597-614.

Riendeau C.J., Kornfeld H. (2003) **THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection.** *Infect Immun* 71:254–259.

Rook G.A., Dheda K., Zumla A. (2005) **Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines.** *Nat Rev Immunol* 5:661-667.

Roser M., Fischer D., Kissel T. (1998) **Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats.** *Eur J Pharm Biopharm* 46:255–263.

Rubin B.K. (2010) **Air and Soul: The Science and Application of Aerosol Therapy.** *Respir Care* 55:912-921.

Russell D.G. (2007) **Who puts the tubercle in tuberculosis?** *Nat Rev Microbiol* 5:39-47.

Sagrístá M.L., Mora M., Madariaga M.A. (2000) **Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules.** *Cell Mol Biol Lett* 5:19-33.

Santos N., Castanho M. (2002) **Liposomes: has the magic bullet hit the target?** *Quim Nov* 25:1181–1185.

Sapra P., Allen T.M. (2003) **Ligand-targeted liposomal anticancer drugs.** *Prog Lipid Res* 42:439–462.

Saraogi G.K., Gupta P., Gupta U.D., Jain N.K., Agrawal G.P. (2010) **Gelatin nanocarriers as potential vectors for effective management of tuberculosis.** *Int J Pharm* 385:143-149.

Saraogi G.K., Sharma B., Joshi B., Gupta P., Gupta U.D., Jain N.K., Agrawal G.P. (2011) **Mannosylated gelatin nanoparticles bearing isoniazid for effective management of tuberculosis.** *J Drug Target* 19:219-227.

Saritha A., Rambhau D., Srinivasan S., Mahalingan K. (2010) **Preparation and evaluation of cationic niosomes encapsulated with micellar solubilized rifampicin.** *J Global Trends in Pharmaceut Sci* 1:7-14.

Sarkar S., Suresh M.R. (2011) **An overview of tuberculosis chemotherapy - a literature review.** *J Pharm Pharm Sci* 14:148-161.

Saunders B.M., Britton W.J. (2007) **Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis.** *Immunol Cell Biol* 85:103–111.

Schaffazick S.R., Stanisçuaski S.G., Freitas L.L., Pohlmann A.R. (2003) **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** *Quím Nova* 26:726-737.

Schluger N.W. (2001) **Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis.** *Respir Res* 2:157-163.

Severino P., Santana M.H., Malmonge S.M., Souto E.B. (2011) **Polymers for drug delivery systems formulations.** *Polímeros* 21:361-368.

Shah N.D., Shah V.V., Chivate N.D. (2012) **Pulmonary Drug Delivery: A Promising Approach.** *J Appl Pharm Sci* 02:33-37.

Shan W., Liu H., Shi J., Yang L., Hu N. (2008) **Self-assembly of electroactive layer-by-layer films of heme proteins with anionic surfactant dihexadecyl phosphate.** *Biophys Chem* 134:101-109.

Sharma R., Muttill P., Yadav A.B., Rath S.K., Bajpai V.K., Mani U., Misra A. (2007) **Uptake of inhalable microparticles affects defence responses of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.** *J Antimicrob Chemother* 59:499–506.

Sharma A., Sharma U.S. (1997) **Liposome in drug delivery: progress and limitations.** *Int J Pharm* 154:123-140.

Sharma A., Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. (2004a) **Chemotherapeutic efficacy of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle encapsulated antitubercular drugs at sub-therapeutic dose against experimental tuberculosis.** *Int J Antimicrob Agents* 24:599-604.

Sharma A., Sharma S., Khuller G.K. (2004b) **Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis.** *J Antimicrob Chemother* 54:761-766.

Shidhaye S.S., Vaidya R., Sutar S., Patwardhan A., Kadam V.J. (2008) **Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers--innovative generations of solid lipid carriers.** *Curr Drug Deliv* 5:324-331.

Shilpa S., Srinivasan B.P., Chauhan M. (2011) **Niosomes as vesicular carriers for delivery of proteins and biological.** *Int J Drug Deliv* 3:14-24.

Sinai A.P., Joiner K.A. (1997) **Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles.** *Annu Rev Microbiol* 51:415-462.

Singh G., Dwivedi H., Saraf S.K., Saraf S.A. (2011) **Niosomal Delivery of Isoniazid - Development and characterization.** *Trop J Pharm Res* 10:203-210.

Smith N.H., Gordon S.V., de la Rúa-Domenech R., Clifton-Hadley R.S., Hewinson R.G. (2006) **Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*.** *Nat Rev Microbiol* 4:670-681.

Souto E.B., Wissing S.A., Barbosa C.M., Müller R.H. (2004) **Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery.** *Int J Pharm* 278:71-77.

Stahl P.D., Rodman J.S., Miller M.J., Schlesinger P.H. (1978) **Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages.** *Proc Natl Acad Sci USA* 75:1399-1403.

Stead W.W., Dutt A.K. (1989) **Tuberculosis in the elderly.** *Semin Respir Infect* 4:189-197.

Sterne J.A., Rodrigues L.C., Guedes I.N. (1998) **Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination?** *Int J Tuberc Lung Dis* 2:200-207.

Suarez S., O'Hara P., Kazantseva M., Newcomer C.E., Hopfer R., McMurray D.N., Hickey A.J. (2001a) **Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: screening in an infectious disease model.** *Pharm Res* 18:1315-1319.

Suarez S., O'Hara P., Kazantseva M., Newcomer C.E., Hopfer R., McMurray D.N., Hickey A.J. (2001b) **Airways delivery of rifampicin microparticles for the treatment of tuberculosis.** *J Antimicrob Chemother* 48:431-434.

Surendiran A., Sandhiya S., Pradhan S.C., Adithan C. (2009) **Novel applications of nanotechnology in medicine.** *Indian J Med Res* 130:689–701.

Takahashi T., Tamura M., Asami Y., Kitamura E., Saito K., Suzuki T., Takahashi S.N., Matsumoto K., Sawada S., Yokoyama E., Takasu T. (2008) **Novel widerange quantitative nested real-time PCR assay for mycobacterium tuberculosis DNA: clinical application for diagnosis of tuberculous meningitis.** *J Clin Microbiol* 46:1698-1707.

Thrupp L., Bradley S., Smith P., Simor A., Gantz N., Crossley K., Loeb M., Strausbaugh L., Nicolle L., SHEA Long-Term-Care Committee (2004) **Tuberculosis prevention and control in long-term-care facilities for older adults.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:1097-1108.

du Toit L.C, Pillay V., Danckwerts M.P (2006) **Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches.** *Res Res* 7:118.

Torchilin V.P. (2005) **Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers.** *Nat Rev Drug Discov* 4:145–160.

Trunz B.B., Fine P., Dye C. (2006) **Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness.** *Lancet* 367:1173-1180.

Turner M.W. (1996) **Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system.** *Immunol Today* 17:532-540.

Ulrichs T., Kaufmann S.H. (2006) **New insights into the function of granulomas in human tuberculosis.** *J Pathol* 208:261–269.

Veldhuizen R., Nag K., Orgeig S., Possmayer F. (1998) **The role of lipids in pulmonary surfactant.** *Biochim Biophys Acta* 1408:90–108.

Verma R.K., Kaur J., Kumar K., Yadav A.B., Misra A. (2008) **Intracellular time course, pharmacokinetics, and biodistribution of isoniazid and rifabutin following pulmonary delivery of inhalable microparticles to mice.** *Antimicrob Agents Chemother* 52:3195-201.

Vila A., Sanchez A., Tobio M., Calvo P., Alonso M.J. (2002) **Design of biodegradable particles for protein delivery.** *J Control Release* 78:15-24.

Vladimirsky M.A., Ladigina G.A. (1982) **Antibacterial activity of liposome-entrapped streptomycin in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*.** *Biomed Pharmacother* 36:375–377.

Vyas S.P., Kannan M.E., Jain S., Mishra V., Singh P. (2004) **Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages.** *Int J Pharm* 269:37–49.

Desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose.

Vyas S.P., Khatri K. (2007) **Liposome-based drug delivery to alveolar macrophages.** *Expert Opin Drug Deliv* 4:95-99.

Vyas S.P., Quraishi S., Gupta S., Jaganathan K.S. (2005) **Aerosolized liposome-based delivery of amphotericin B to alveolar macrophages.** *Int J Pharm* 296:12-25.

Weers J., Metzheiser B., Taylor G., Warren S., Meers P., Perkins W.R. (2009) **A gamma scintigraphy study to investigate lung deposition and clearance of inhaled amikacin-loaded liposomes in healthy male volunteers.** *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 22:131-138.

WHO (1994) **Framework for effective tuberculosis control.** *World Health Organization*, Geneva.

WHO (2007) **Definition of a new sputum smearpositive TB case.** *The World Health Organization*, Geneva.

WHO (2010) **Treatment of Tuberculosis. Guidelines for National Programmes** 4th ed. *The World Health Organization*, Geneva.

WHO (2011) **Global tuberculosis control: WHO report 2011.** *The World Health Organization*, Geneva.

Wijagkanalan W., Kawakami S., Takenaga M., Igarashi R., Yamashita F., Hashida M. (2008) **Efficient targeting to alveolar macrophages by intratracheal administration of mannosylated liposomes in rats.** *J Control Release* 125:121–130.

Wildner L.M., Nogueira C.L., Souza B.S., Senna S.G., Silva R.M., Bazzo M.L. (2011) **Micobactérias: Epidemiologia e Diagnóstico.** *Rev Patol Trop* 40:207-229.

Witschi C., Doelker E. (1998) **Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing.** *J Control Release* 51:327-341.

Yang W., Peters J.I., Williams R.O. (2008) **Inhaled nanoparticles - a current review.** *Int J Pharm* 356:239–247.

Yarosh D.B. (2001) **Liposomes in investigative dermatology.** *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17:203-212.

Yew W.W. (2002) **Clinically significant interactions with drugs used in the treatment of tuberculosis.** *Drug Saf* 25:111-133.

Yoshioka T., Stermberg B., Florence A.T. (1994) **Preparation and properties of vesicles (niosomes) of sorbitan monoesters (Span 20, 40, 60, and 80) and a sorbitan triester (Span 85).** *Int J Pharm* 105:1-6.

Young D.B. (1994) **Strategies for new drug development.** *In: Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control.* Bloom B.R., Ed. *American Society for Microbiology* 559–568. Washington.

Zaru M., Manca M.L., Fadda A.M., Antimisiaris S.G. (2009) **Chitosan-coated liposomes for delivery to lungs by nebulisation**. *Colloids Surf Biointerfaces* 71:88-95.

Zaru M., Mourtas S., Klepetsanis P., Fadda A.M., Antimisiaris S.G. (2007) **Liposomes for drug delivery to the lungs by nebulization**. *Eur J Pharm Biopharm* 67:655–666.

Zhang L., Granick S. (2006) **How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles)**. *Nano Lett* 6:694-698.

Zhang L., Pornpattananankul D., Hu -M.J., Huang C.-M. (2010) **Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery**. *Curr Med Chem* 17:585-594.

Zhang J., Smith E. (2011) **Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles**. *J Pharm Sci* 100:896-903.

Zhou A., Guo L., Tang L. (2003) **Effect of an intrathoracic injection of sodium hyaluronic acid on the prevention of pleural thickening in excess fluid of tuberculous thoracic cavity**. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:203-205.

Zhou H., Zhang Y., Biggs D.L., Manning M.C., Randolph T.W., Christians U., Hybertson B.M., Ng K. (2005) **Microparticle-based lung delivery of INH decreases INH metabolism and targets alveolar macrophages**. *J Contr Rel* 107:288-299.