

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA E FARMACOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

GUILHERME SANTOS RAMOS

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO FULEROL E EFEITO HEPATOPROTETOR
NA QUIMIOTERAPIA ANTIMONIAL EM MODELO MURINO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL**

BELO HORIZONTE
2014

GUILHERME SANTOS RAMOS

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO FULEROL E EFEITO HEPATOPROTETOR
NA QUIMIOTERAPIA ANTIMONIAL EM MODELO MURINO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof^o. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard

Co-orientador: Prof^a Maria Norma Melo (Departamento de Parasitologia - UFMG)

BELO HORIZONTE

2014

Ramos, Guilherme Santos.

Atividade antileishmania do fulerol e efeito hepatoprotetor na quimioterapia antimonial em modelo murino de leishmaniose visceral [manuscrito] /
Guilherme Santos Ramos. – 2014.

58 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Frédéric Jean Georges Frézard. Co-orientadora: Maria Norma
Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Fisiologia e Biofísica.

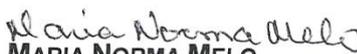
**"ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO FULEROL E EFEITO
HEPATOPROTETOR NA QUIMIOTERAPIA ANTIMONIAL EM
MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE VISCERAL"**

GUILHERME SANTOS RAMOS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 09 de dezembro de 2014, pela
Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROFA. DR^a. MÔNICA CRISTINA DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. RICARDO TOSHIO FUJIWARA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DR^a. MARIA NORMA MELO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADORA


PROF. DR. FRÉDÉRIC JEAN GEORGES FRÉZARD
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 09 de dezembro de 2014

Este trabalho contou com a colaboração de:

- Dra. Kelly Cristina Kato, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB, UFMG
- Dra. Marina Silva Ladeira, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB, UFMG
- Ms. Priscila Gomes dos Reis, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB, UFMG
- Prof^a. Dra Paula Peixoto Campos, Departamento de Patologia, ICB, UFMG
- Prof^o. Dr. Luiz Orlando Ladeira e Maurício Veloso Brant Araújo, Departamento de Física, ICEX, UFMG
- Prof^o. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG

“Tudo, aliás, é a ponta de um mistério, inclusive os fatos. Ou a ausência deles. Dúvida? Quando nada acontece há um milagre que não estamos vendo.”

Guimarães Rosa

Aos meus pais e mestres, aos meus amigos e à minha amada esposa, para toda a vida, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida

Aos meus pais e meus irmãos pelo apoio incondicionável

À minha amada esposa pelo apoio, carinho e paciência

Ao professor Frédéric Frézard pela generosidade e orientação, sempre presentes

À professora Norma pela orientação e incentivo

À Soraia pela força e ajuda

À professora Paula Peixoto Campos, pela auxílio, sempre que precisei

À Kelly Cristina Kato pela ajuda, paciência e conselhos

À Priscila Gomes dos Reis por se sacrificar em prol do nosso trabalho e toda ajuda prestada

Aos colegas, Juliane, Nayara, Adriel, Ana Paula, Adalberto, Virgínia e Jonas.

RESUMO

Frente as limitações do tratamento atual das leishmanioses com antimoniais pentavalentes, essa dissertação teve como primeiro objetivo avaliar o impacto da utilização do fulerol, que é uma nanoestrutura esférica de carbono solúvel em água e um potente antioxidante, na prevenção da hepatotoxicidade do medicamento antimonial glucantime. De forma inédita, procurou-se avaliar também a atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* do fulerol em modelo murino de leishmaniose visceral (LV). Ambas as avaliações de eficácia e de toxicidade foram realizadas em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* que receberam durante 20 dias o fulerol por via intraperitoneal, seja na forma livre (0,05 mg/kg) ou na forma encapsulada em lipossomas (0,05 ou 0,2 mg/kg/4 dias), em associação ou não com glucantime (120 mg Sb/kg/dia). Os controles positivo e negativo receberam glucantime e salina, respectivamente. A avaliação de carga parasitária por PCR quantitativa mostrou, de forma surpreendente, que o tratamento com doses diárias do fulerol livre a 0,05mg/kg reduziu significativamente as cargas parasitárias hepática e esplênica, em níveis equivalentes àsquelas do grupo tratado com glucantime. Na administração de doses a cada 4 dias, apenas a forma lipossomal do fulerol promoveu uma redução significativa da carga parasitária. No grupo que recebeu fulerol lipossomal a 0,2mg/kg, o número de parasitos foi significativamente menor que no grupo glucantime, sendo que não foi possível detectar parasito no fígado. Enquanto o tratamento com glucantime associado ao fulerol não mostrou maior eficácia que aquele com fulerol, houve uma redução significativa das alterações hepáticas quando comparado ao grupo tratado apenas com glucantime. Os benefícios incluem redução da proporção de hepatócitos ingurgitados e do índice apoptótico, corroborado pelo ensaio de TUNEL. Em relação a atividade antileishmania do fulerol *in vitro*, a utilização do fulerol numa concentração não citotóxica para macrófagos peritoneais (0,12 mg/ml) diminuiu a proporção de amastigotas no interior de macrófagos infectados em cerca de 75% quando comparados ao grupo controle (não tratado). Em conclusão, o tratamento com fulerol resulta tanto em ação antileishmania, quanto em proteção contra a hepatotoxicidade do glucantime em modelo murino de LV, evidenciando potencial como fármaco na terapia dessa doença.

Palavras-chave: Leishmaniose; Antimônio, Quimioterapia; Fulerol, Lipossomas

ABSTRACT

Due to the limitations of the actual treatment of leishmaniasis using pentavalent antimonials, such as glucantime, a first aim of this study was to evaluate the impact of fullerol, which is a spherical water-soluble carbon nano particle and a potent antioxidant, in the prevention of hepatotoxicity caused by glucantime. For the first time, the fullerol antileishmanial activity was assessed *in vitro* and *in vivo* using a murine model of visceral leishmaniasis (VL). Both evaluations of efficacy and toxicity were performed in BALB/c mice infected with *L. infantum*, which received free fullerol (0.05 mg/kg) for 20 days intraperitoneally or liposome-encapsulated fullerol (0.05 or 0.2 mg/kg/4 days), with or without glucantime (120 mg Sb/kg/day). Positive and negative controls received glucantime and saline, respectively. Evaluation of parasite load by quantitative PCR showed, surprisingly, that treatment with daily doses of free fullerol 0.05 mg/kg significantly reduced the liver and spleen parasite burdens at levels equivalent to those of the group treated with glucantime. When doses were given every 4 days, only liposomal fullerol caused a significant reduction in parasite load. In the group that received liposomal fullerol at 0.2 mg/kg, the number of parasites was significantly lower than in glucantime group, and we could not detect parasite in the liver. While treatment with glucantime associated with fullerol showed a similar efficacy compared to free fullerol, there was a significant reduction of liver histopathological changes when compared to the group treated with only glucantime. The benefits include reduction in the proportion of swollen hepatocytes and apoptotic index, supported by TUNEL assay. Regarding *in vitro* leishmanicidal activity, the use of fullerol at a non-cytotoxic concentration to peritoneal macrophages (0.12 mg/ml) significantly reduced by 75% the number of amastigotes inside macrophages. In conclusion, our data establish for the first time the antileishmanial activity of fullerol and its protection against glucantime hepatotoxicity in murine model of VL, showing potential as drug against VL.

Keywords: Leishmaniasis; Antimony, Chemotherapy; Fullerol, Liposomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição das leishmanioses visceral (a) e cutânea ou tegumentar (b) no Mundo.	1
Figura 2- Imagens das diferentes formas do parasito <i>Leishmania</i> . Forma promastigota (a) e amastigota (b) no interior de macrófago.....	3
Figura 3 - Ciclo biológico do parasita <i>Leishmania</i> sp.....	5
Figura 4 - Estrutura química do antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio	6
Figura 5 - Características gerais de um Lipossoma.....	12
Figura 6 – Fulerol C ₆₀ (OH) ₂₄	13
Figura 7 - Representação esquemática de técnicas de Histologia	25
Figura 8– Esquema representativo da técnica de TUNEL	27
Figura 9– Viabilidade de macrófagos peritoneais expostos ao fulerol.....	28
Figura 10– Atividade antileishmania in vitro do fulerol associado ou não ao Glucantime.	29
Figura 11– Micrografias ilustrativas de macrófagos peritoneais infectados com <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes tratamentos por 72 horas.....	30
Figura 12– Atividade antileishmania do fulerol livre e encapsulado em lipossomas no fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i>	31
Figura 13– Atividade antileishmania do fulerol livre e encapsulado em lipossomas no baço de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i>	32
Figura 14– Eficácia do tratamento combinado com fulerol e glucantime em modelo murino de LV.....	33
Figura 15– Eficácia do tratamento combinado com fulerol lipossomal e glucantime em modelo murino de LV	34
Figura 16– Efeito do co-tratamento com fulerol na forma livre ou encapsulada em lipossomas na captação hepática de Sb após quimioterapia antimonial	35
Figura 17– Hepatoproteção do fulerol em modelo murino de LV submetido a quimioterapia antimonial	36
Figura 18 – Efeito do fulerol livre na degeneração hidrópica em hepatócitos de animais com <i>L. infantum</i>	37

Figura 19 –Efeito do fullerol livre e encapsulado em lipossomas na degeneração hidrópica nos hepatócitos de animais com LV.....	37
Figura 20 –Efeito do fullerol na apoptose dos hepatócitos em modelo murino de LV submetido a quimioterapia antimonial	39
Figura 21 –Efeito do fullerol na apoptose dos hepatócitos avaliada pela técnica de Tunel em modelo murino de LV submetido a quimioterapia antimonial.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido Ascórbico
AM - Antimoniato de Meglumina
ATP – Adenosina trifosfato
COL - Colesterol
Ct – CycleTreshold
Cys - Cisteína
Cys-Glys – Cisteinil-Glicina
DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico
DPPG - Dipalmitoilfosfatidilglicerol
DSPC - Diestearoilfosfatidilcolina
ECG – Eletrocardiograma
FDA – Food and Drug administration
Ful - Fulerol
Gluc - Glucantime
GTP – Guanosina trifosfato
IFN- γ – Interferon Gama
INOS – NOS2
IP – Intraperitoneal
LC – Leishmaniose cutânea
LV - Leishmaniose visceral
NaCL – Cloreto de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
NO – Óxido Nítrico
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCR – Reação em cadeia de polimerase
ROS - Espécies reativas de oxigênio
Sb - Antimônio
Sb (V) – Antimônio pentavalente
T (SH)₂– Tripanotona Redutase
TBAH – Tetrabutílamônio
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1- REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 - Epidemiologia das leishmanioses	1
1.2 - Manifestações clínicas das leishmanioses	2
1.3 - Formas evolutivas do agente etiológico	3
1.4 - Ciclo biológico	4
1.5 - Tratamento das Leishmanioses.....	5
1.5.1 - Antimoniais Pentavalentes e limitações	6
1.5.2 - Alternativas terapêuticas	7
1.5.3 - Terapia combinada	8
1.6 - Mecanismos envolvidos na ação e toxicidade dos antimoniais pentavalentes.....	8
1.7 - Associação de fármacos antimoniais com anti-oxidante.....	9
1.8 - Nanossistemas carreadores de fármacos	10
1.9 - Fulerol.....	12
1.9.1 - Estrutura e propriedades físico-químicas	12
1.9.2 -Aplicações dos fulerenos	13
2 - OBJETIVOS	15
2.1 - Objetivo Geral	15
2.2 - Objetivos Específicos	15
3 - JUSTIFICATIVA.....	16
4- MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 - Hidroxilação do Fulerol.....	18
4.2 - Preparação das formulações lipossomais contendo Fulerol	18
4.3 - Testes in vitro de citotoxicidade e de atividade antileishmania	19
4.3.1-Ensaio de citotoxicidade.....	19
4.3.2 - Atividade no modelode macrófago infectado com leishmania	20
4.4 - Tratamento sub-agudo com fulerol com ou sem antimonial de camundongos infectados com L. infantum e avaliação de eficácia	20
4.4.1 - Infecção	20
4.4.2 -Tratamento.....	21
4.4.3 - Avaliação de carga parasitária.....	22
4.4.3.1 Extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio.....	22

4.4.3.2. Determinação da Carga Parasitária por qPCR	23
4.5 Doseamento hepático de Sb	23
4.6 Análises histopatológicas	24
4.6.1 Hematoxilina-Eosina	24
4.6.2 Índice apoptótico	25
4.7 Análises estatísticas	27
5-RESULTADOS	28
5.1 Características da formulação de fulerol em lipossomas	28
5.2 Atividade antileishmania do fulerol em modelo de macrófago infectado por Leishmania.....	28
5.2.1 Citotoxicidade do fulerol em macrófagos peritoneais	28
5.2.2 Atividade antileishmania in vitro.....	29
5.3 Atividade antileishmania in vivo do fulerol na forma livre ou encapsulada em lipossomas em modelo murino de LV	30
5.3.1 Atividade do fulerol livre e encapsulado em lipossomas	30
5.3.2 Eficácia do fulerol em associação com glucantime	32
5.3.3 Captação hepática de Sb	34
5.4 Alterações histopatológicas e citotoxicidade no tecido hepático.....	35
5.4.1 Degeneração hidrópica	35
5.4.2 Índice apoptótico	38
6 - DISCUSSÃO.....	41
7 - CONCLUSÃO	44
8- REFERÊNCIAS	45
9- ANEXOS.....	55

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses abarcam um conjunto de doenças infecto-parasitárias ocorrendo em 98 países do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. Anualmente ocorrem aproximadamente 2 milhões de novos casos, dos quais, 1,5 milhões são de leishmaniose cutânea (LC) e 500.000 de leishmaniose visceral (LV). Estima-se que as leishmanioses acometem aproximadamente 12 milhões de pessoas no mundo (Figuras 1a e 1b) (Alvar et al., 2012).

Existem três manifestações clínicas principais, sendo elas: visceral, cutânea e mucocutânea. Todas causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, da família dos Trypanosomatidae (Amato et al., 2000).

a)



b)

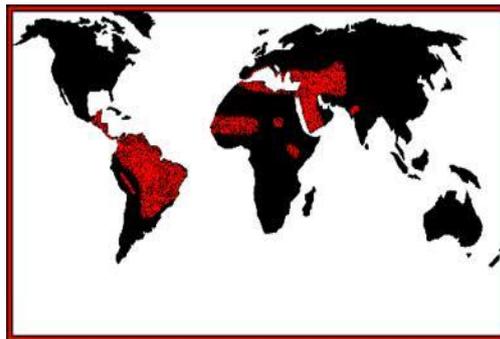


Figura 1: Distribuição das leishmanioses visceral 1 (a) e cutânea ou tegumentar (b) no Mundo. As regiões acometidas pela doença estão marcadas em vermelho.

As duas formas clínicas mais comuns de leishmanioses, a visceral e a cutânea, ocorrem em áreas tropicais e sub-tropicais, inclusive em torno do Mediterrâneo. A LV pode ser encontrada em países de clima relativamente frio, como Portugal, França, Espanha, Grécia e em países dos Bálcãs. A leishmaniose tegumentar também pode ocorrer em países de clima temperado. Dessas formas, a LV é potencialmente fatal, se não tratada (WHO, 2014).

O Brasil é um dos países que se destaca onde ambas, leishmaniose visceral e cutânea estão presentes com alta endemicidade. O país apresenta o maior número de casos de LV na América Latina e está entre os dez países que apresentam 70-75% de leishmaniose cutânea no mundo (WHO, 2010; Alvar et al., 2012).

Nas Américas, pelo menos oito diferentes espécies do gênero *Leishmania* são os principais agentes etiológicos da leishmaniose, incluindo *Leishmania (Leishmania) infantum*,

Leishmania (Leishmania) amazonensis e *Leishmania (Viannia) braziliensis* que apresentam áreas de sobreposição de transmissão e estão associadas com as leishmanioses visceral e cutânea (Grimaldi et al., 1989; Gontijo e Carvalho, 2003).

As manifestações clínicas e a evolução da infecção são dependentes de complexas interações entre a virulência característica das diferentes espécies do gênero e a resposta imunológica mediada por células do hospedeiro.

Dependendo da fonte de infecção no ser humano, as leishmanioses podem ser consideradas zoonoses onde o homem apresenta-se como hospedeiro secundário e os hospedeiros reservatórios são os animais silvestres ou domésticos. As espécies, *L. donovani*, na Índia, e, *L. tropica* no leste da África, estão associadas com a característica antroponótica da leishmaniose, em que o reservatório é o próprio homem, ou seja a transmissão é realizada entre humanos (Magill, 1995).

1.2 Manifestações clínicas das leishmanioses

No hospedeiro vertebrado, uma das características marcantes do gênero *Leishmania* é a variedade de manifestações clínicas, que vão desde casos assintomáticos na LC e na LV até casos graves com infecções mucosas na leishmaniose cutâneo-mucosa ou casos fatais, quando não tratados na LV (Garin, 2005). A LC, a forma mais comum, causa ulcerações na pele com lesões de bordas elevadas e fundo granulomatoso, normalmente indolor e que apresenta em alguns casos, cura espontânea dentro de poucos meses, deixando cicatrizes no local. As lesões cutâneas atingem comumente regiões expostas do corpo como face, braços e pernas. Já a forma difusa da leishmaniose cutânea, é caracterizada pelo aparecimento de lesões não ulceradas, repletas de parasitos e disseminadas por toda a pele do paciente. Na muco-cutânea, as lesões podem destruir total ou parcialmente as membranas mucosas do nariz, boca, cavidade nasofaríngea e tecidos adjacentes. Esta forma de leishmaniose também é conhecida como espúndia, ferida brava, nariz de tapir e úlcera de bauru (Amato, 2009). A LV popularmente conhecida como Kala-azar ou febre negra, acomete as vísceras dos hospedeiros e os órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, tais como a medula óssea, o baço, o fígado e os linfonodos, embora possam ser encontrados em todos os tecidos. É caracterizada inicialmente por febre alta, dor abdominal, diarreia, hipertrofia e hiperplasia do sistema macrofágico das vísceras. Ocorrem ainda alterações na medula óssea, com conseqüente leucopenia e anemia, fruto da substituição do tecido hematopoiético pelos monócitos parasitados. É considerada a forma mais grave da doença (Hashim, 1995).

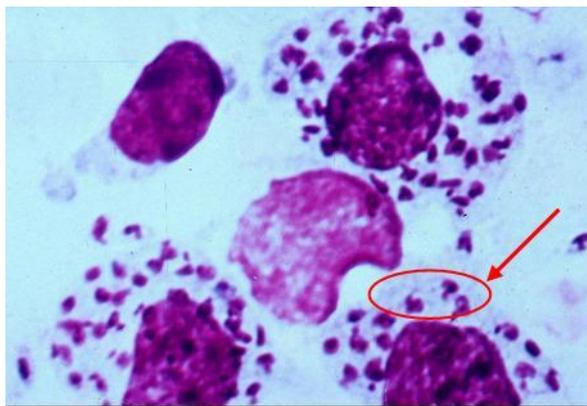
1.3 Formas evolutivas do agente etiológico

Existem duas formas evolutivas principais: promastigotas, que possui flagelo, encontra-se no meio extracelular e no tundo digestório do inseto vetor, e outra amastigota, que cujo flagelo não se exterioriza, intracelular obrigatória e é observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Figuras 2a e 2b).

a)



b)



Forma 2: Imagens das diferentes formas do parasito *Leishmania*. (a) forma promastigota e (b) forma amastigota no interior de macrófago (indicada pela seta vermelha).

Fonte: www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila_on_line/origem_classificacao.htm

1.4 Ciclo biológico

O ciclo de transmissão do parasito (Figura 3) se inicia quando a fêmea do inseto vetor, ao fazer o repasto sanguíneo em um mamífero infectado ingere macrófagos contendo a forma amastigota da *Leishmania*. No tubo digestório, as amastigotas permanecem junto com o sangue ingerido, contido na matriz peritrófica, composta principalmente por proteínas e quitina, e cerca de 12 a 18 horas depois dão origem a formas flageladas pequenas, ovóides, de pouco movimento, chamadas promastigotas procíclicas. Essas formas se multiplicam por divisão binária e são capazes de se aderir ao epitélio intestinal do flebotomíneo devido a um conjunto de glicoproteínas de membrana. A adesão propiciada por tais moléculas impede que o parasito seja expelido com as excretas do flebotomíneo, após digestão do sangue (Sacks, 1995). As promastigotas procíclicas passam por mudanças morfológicas e fisiológicas no tubo digestório do vetor, e parte dessa população se diferencia em formas metacíclicas, através de um processo chamado metaciclogênese, onde há uma mudança no perfil de moléculas citoplasmáticas e de membrana do parasito, o que garante a sua liberação do tubo digestório do inseto vetor, tornando-as mais infectantes às células do hospedeiro mamífero (Pimenta, 2012). Quando o inseto vetor realiza um novo repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado susceptível, as formas infectantes da *Leishmania* são inoculadas diretamente da probóscide e são regurgitadas, juntamente com a saliva do inseto (Schlein, 1993). A saliva dos flebotomíneos exerce papel importante na transmissão da *Leishmania*, potencializa a infecção, através da sua capacidade anticoagulante, por conter peptídeos de grande poder vasodilatador, ou por apresentar moléculas imuno-estimulantes na sua composição (Castro-Sousa, 2001). Uma vez no interior do hospedeiro vertebrado as promastigotas metacíclicas podem ser fagocitadas por neutrófilos, células dendríticas ou macrófagos. Após a internalização, essas formas são vulneráveis à acidez e a ação das enzimas líticas dos fagolisossomas e se diferenciam em formas amastigotas (Olivier, 2005). Estas evadem a resposta imune microbicida e multiplicam-se por divisão binária até a morte e a ruptura dos macrófagos infectados, permitindo a liberação das amastigotas e favorecendo a fagocitose destas por outras células do sistema mononuclear fagocitário (Vaniier-Santos, 2002). O inseto vetor ao realizar o repasto sanguíneo neste hospedeiro ingere, junto ao sangue, macrófagos infectados, perpetuando o ciclo biológico do parasito.

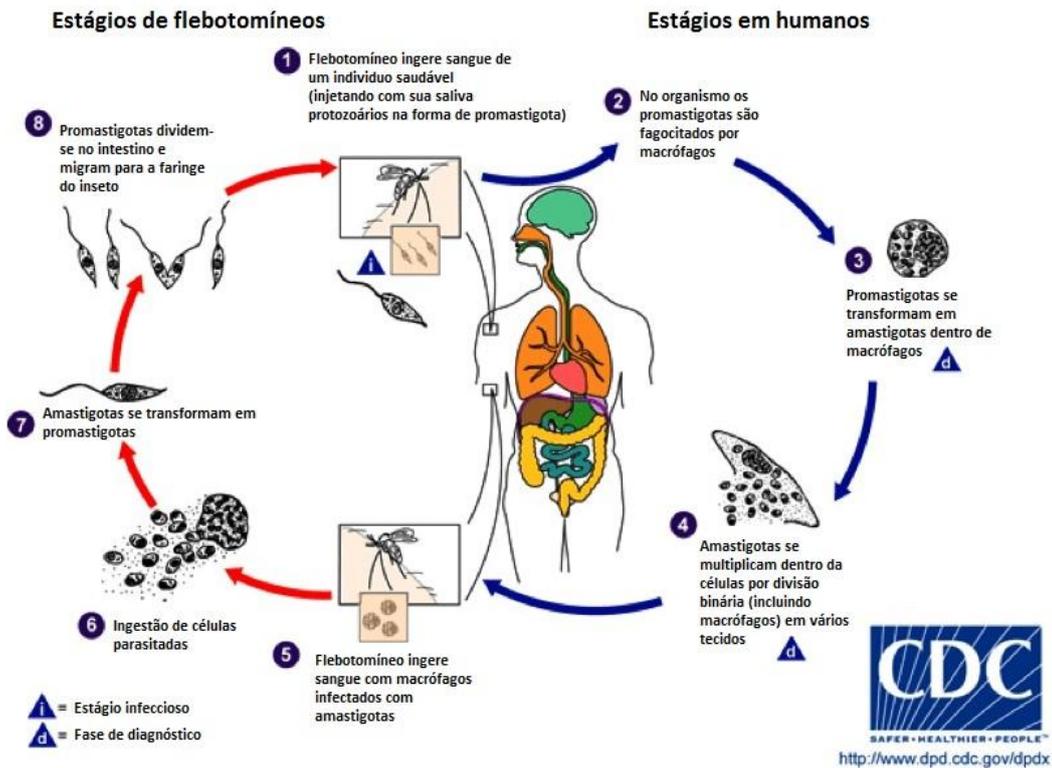


Figura 3: Ciclo biológico do parasito *Leishmania* sp.

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

1.5 Tratamento das Leishmanioses

Na ausência de vacinas, o controle de todas as formas de leishmanioses no homem depende da ação de quimioterápicos (Marjukka, 1999), sendo a principal medida para o tratamento de todas as formas da leishmaniose. Os fármacos utilizados atualmente são dispendiosos, apresentam eficácia limitada e na maioria dos casos, efeitos adversos graves.

Os antimoniais trivalentes foram utilizados pela primeira vez em 1912 pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, logo após o reconhecimento em 1904 de que as espécies de *Leishmania* eram a causa da leishmaniose. Embora os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostam, Glaxo Smith Klein) (Figura 4b) e o antimoniato de meglumina (AM) (Glucantime, Sanofi-Aventis), tenham sido reconhecidos como clinicamente eficazes em 1947, estes ainda são os fármacos de primeira escolha para todas as formas de leishmanioses em todos os países (Berman, 1997).

1.5.1 Antimoniais pentavalentes e suas limitações

O AM (figura 4a) é o derivado de antimônio pentavalente atualmente em uso no Brasil veiculado comercialmente como Glucantime®. Sua baixa absorção oral e sua elevada depuração plasmática determinam que seja administrado diariamente por via parenteral (endovenosa ou intramuscular) por um período de 20 a 40 dias.

Os efeitos colaterais representam um problema importante no uso dos antimoniais pentavalentes. Estes aparecem principalmente ao final do tratamento e incluem náuseas, vômitos, diarreia, artralgias, mialgias, anorexia, elevação dos níveis de enzimas hepáticas, anomalias eletrocardiográficas, convulsões, pancreatite química e nefrotoxicidade. Reclamações de pacientes com sensação de dor no local e no momento da aplicação desses medicamentos são também comuns.

Outro problema na terapêutica dessa doença no Brasil é sua grande ocorrência em zonas rurais, o que dificulta a assistência aos pacientes que têm que se deslocar até um centro de saúde para receber o tratamento sob controle médico. Nesse contexto, os casos de interrupção de tratamento se tornam freqüentes, o que pode resultar no aparecimento de resistência ao medicamento sendo um dos fatores mais importantes na reemergência dessa doença em todo o mundo (DNI, 2014).

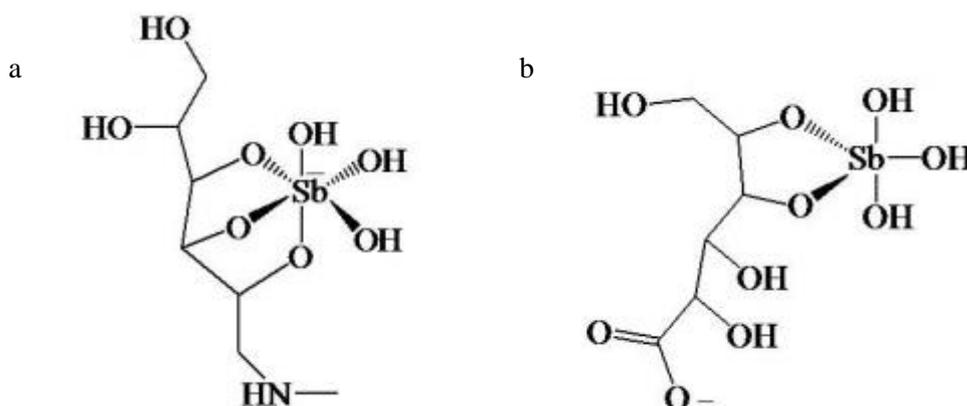


Figura 4: Estrutura química do antimoniato de meglumina (a) e estibogluconato (b).

Fonte: Frézard, Demicheli e Ribeiro. Pentavalent Antimonials: New Perspective for Old Drugs. *Molecules* 2009.

1.5.2 Alternativas terapêuticas

Os fármacos que constituem alternativa terapêutica aos antimoniais incluem a anfotericina B e a pentamidina. A anfotericina B é um medicamento tóxico e os pacientes necessitam de monitorização constante, estando o tratamento associado à hospitalização prolongada, de até 5 semanas (Sundar et al., 2006). A elevada toxicidade da pentamidina combinada à diminuição da sua eficácia no tratamento de pacientes, sugerindo resistência, levaram ao abandono deste medicamento no tratamento das leishmanioses na Índia (Freitas-Junior et al., 2012). Dentre os medicamentos que podem vir a substituir os antimoniais pentavalentes destacam-se:

- **Anfotericina B Lipossomal** (AmBisome – Atellas Pharma, USA). Foi desenvolvida inicialmente como antifúngico e sua potencial utilidade no tratamento de LV foi investigada por causa da distribuição excelente para o compartimento intracelular, onde residem os parasitas no hospedeiro humano (Schettini et al., 2003). Apresenta biodisponibilidade e propriedades farmacocinéticas otimizadas, com redução considerável dos efeitos colaterais, quando comparado à formulação convencional da anfotericina B. É um medicamento aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de LV e LC já que, além da toxicidade reduzida, tem elevada eficácia, com cerca de 90% de cura. A principal limitação de seu uso é o custo elevado (Freitas-Junior et al., 2012).
- **Miltefosina** (Impavido –Aeterna Zentaris). Originalmente desenvolvida como agente antitumoral, porém, provou ser clinicamente ineficaz. Em estudos clínicos conduzidos na Índia, o tratamento por via oral apresentou elevada eficácia contra a leishmaniose visceral humana (Sundar et al., 2002). No entanto, sua utilização está associada a alguns inconvenientes importantes como teratogenicidade e, por vezes, toxicidades gastrointestinal e renal graves, assim como elevado potencial de desenvolvimento de resistência (Sundar et al., 2006).
- **Paromomicina ou aminosidina.** É um aminoglicosídeo usado no tratamento de infecções causados por bactérias gram-positivas e gram-negativas e por parasitoses como giardíase e amebíase. As apresentações endovenosa e tópica tem sido usadas para o tratamento de LV e LC respectivamente (Jhingran et al., 2009).

O pequeno número de fármacos disponíveis associado às limitações encontradas no seu uso aponta para a necessidade urgente de desenvolver novos fármacos ou formulações ou de aprimorar os fármacos existentes através de terapia combinada.

1.5.3 Terapia combinada

A associação entre fármacos quimioterápicos se mostra uma das tendências atuais na busca de novas estratégias terapêuticas para as leishmanioses, uma vez que a combinação de drogas poderia retardar ou prevenir a emergência da resistência, aumentar a eficácia, diminuir o tempo de tratamento e resultar num tratamento mais seguro (Loiseau et al., 1992; Mbongo et al. 1997).

Várias associações de medicamentos leishmanicidas mostraram-se sinérgicas no tratamento das leishmanioses. Um dos exemplos que podemos citar é a combinação da gentamicina à paramomicina em que a primeira aumentou a eficácia da segunda em aplicação tópica. Outra associação benéfica foi a combinação de aminosidina com o antimonial estibogluconato de sódio, que por sua vez mostrou ser bastante eficaz no tratamento da forma visceral refratária ao tratamento convencional. De maneira semelhante, a associação desse antimonial com o alopurinol se mostrou eficaz até mesmo em casos de resistência aos antimoniais (Martinez et al., 1997).

Estudos envolvendo a associação de medicamentos, incluindo a anfotericina B lipossomal e miltefosina, foram conduzidos em pacientes com calazar na Índia. O tratamento demonstrou uma eficácia superior a 95%, sendo que os efeitos adversos da terapia combinada foram bem tolerados. Essa associação permitiu ainda reduzir o custo associado ao tratamento total com anfotericina B lipossomal e manter a eficácia elevada (Sundar et al., 2011).

1.6 Mecanismos envolvidos na ação e toxicidade dos antimoniais pentavalentes

A estrutura e composição química, assim como o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes em uso não foram ainda totalmente elucidados (Berman, 1997; Haldar, 2011; Frezard, 2009). A depleção de níveis intracelulares de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) devido à interferência na glicólise e β -oxidação de ácidos graxos em amastigotas foi proposto como possível mecanismo de ação (Sundar et al., 2002; Jhingran, 2009). Outro modelo geralmente aceito, apresentado pela primeira vez em 1943 por Goodwin e Page, é o que descreve o Sb(V) como um pró-fármaco, sendo o Sb(V) reduzido à forma

ativa e tóxica Sb(III). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa indicam que biomoléculas que contêm o grupo sulfidril (tiol) podem ser os responsáveis por esta conversão. Essas biomoléculas incluem: a glutathione (GSH), principal tiol do citosol de células mamíferas; cisteína (Cys) e cisteinil-glicina (Cys-Gly), tióis predominantes no lisossomo e tripanotona ($T(SH)_2$), principal tiol intracelular do parasita *Leishmania*. Além disso, esta redução é favorecida em pH ácido e temperatura elevada, características semelhantes aos fagolisossomos dos macrófagos, local onde o parasita reside (Berman, 1997; Haldar e Roy, 2011; Frezard, 2009). Hansen e colaboradores (2011) observaram, após exposição *in vitro* de linhagem celular de macrófagos humano (Mono Mac 6) ao antimônio pentavalente, que ocorre a redução de Sb(V) a Sb(III). Também foi evidenciada redução de Sb(V) a Sb(III) em paciente tratado com antimônio de meglumina (Berman et al., 1985).

Wyllie e colaboradores (Wyllie e Fairlamb, 2006; Wyllie e Cunningham, 2004) relataram que Sb(III) promove um desbalanço no metabolismo dos tióis tanto em linhagem de células leucêmicas quanto no parasito *Leishmania*, consistindo na redução da concentração intracelular de tiol e no aumento da relação tiol oxidado/tiol reduzido. Esses efeitos foram atribuídos à complexação do Sb(III) pelos tióis intracelulares na forma reduzida e à inibição da glutathione redutase em células de mamíferos e da tripanotona redutase em *Leishmania*. Como os tióis intracelulares reduzidos participam da proteção da célula contra espécies reativas de oxigênio (ROS), o Sb(III) aumenta o estresse oxidativo tanto em células de mamíferos quanto em *Leishmania* (Wyllie, 2006). Um estudo recente mostra que a apoptose induzida pelo Sb(III) em *Leishmania* está associada ao aumento de produção de ROS (Moreira et al., 2011).

Os antimônios também podem induzir produção de ROS e de óxido nítrico (NO) em macrófagos murinos, facilitando assim a eliminação do parasita (33). No sistema murino, os macrófagos produzem IL-12, que estimula células TCD4⁺ e células Normal Killer a liberarem Interferon-gama (IFN- γ) polarizando a resposta imune do tipo Th1. IFN- γ tem apresentado sinergismo com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ativando óxido nítrico sintetase (iNOS, também conhecido como NOS²) e produzindo NO que resulta na morte do parasita intracelular. O NO é gerado pela oxidação dos átomos pela L-arginina através da óxido nítrico sintase (NOS) e no modelo murino exerce um papel importante no controle da infecção, mas o seu papel ainda não está completamente elucidado (Giudice et al., 2007).

1.7 Associação de fármacos antimoniais com anti-oxidante

Um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que o co-tratamento com o antioxidante ácido ascórbico (AA) permite reduzir a hepatotoxicidade na quimioterapia antimonial em modelo murino de LV (Kato et al., 2014). Sendo que os fármacos antimoniais parecem exercer sua toxicidade pela indução de estresse oxidativo, foi proposto que o efeito do AA seja devido a sua ação anti-oxidante ou *scavenger* de radicais livres (Cameron et al., 1979; Wensel et al., 2004 e Gonzales et al., 2005).

É também interessante mencionar que, em doses elevadas não fisiológicas, o AA vêm sendo utilizado como pró-oxidante no tratamento do câncer em associação com substâncias derivadas do arsênio (Cameron et al., 1979). Isto sugere que ações semelhantes poderiam ser alcançadas com fármacos antimoniais em associação com outras substâncias anti-oxidantes, tais como o fulerol.

1.8 Nanossistemas carreadores de fármacos

Entre os nanossistemas carreadores de fármacos mais utilizados atualmente, estão os lipossomas, que são vesículas artificiais esféricas microscópicas constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, que separam compartimentos aquosos internos do meio externo. O diâmetro médio dessas vesículas pode variar entre 20nm a 5µm. A característica típica dos lipídios que formam a bicamada é sua natureza anfifílica: uma cabeça polar ligada a uma ou duas cadeias carbônicas hidrofóbicas. Quando estes lipídios são expostos a um meio aquoso, interações hidrofílicas entre as cabeças polares e a água e o efeito hidrofóbico que afasta as cadeias carbônicas da fase aquosa, levam à formação espontânea de bicamadas lipídicas fechadas (Figura 5).

Os lipossomas são geralmente, preparados a partir de lipídios não iônicos ou zwitteriônicos tais como a fosfatidilcolina e sua carga superficial pode ser modificada pela incorporação de lipídios carregados positiva ou negativamente e a fluidez alterada através da adição de colesterol (Frézard, 1999). São sistemas altamente versáteis, cujas características como tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos, podendo, inclusive, encapsular fármacos hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos. Outra vantagem dos lipossomas em relação a outros nanossistemas carreadores de fármacos é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando são formados de lipídios

naturais (Frézard, 2005). Além disso a administração de fármacos encapsulados nesses lipossomas resulta no aumento de sua concentração nos órgãos do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), como fígado, baço e medula óssea, assim como na redução da concentração em órgãos apresentando capilares contínuos. A captura celular dos lipossomas é favorecida pelo processo de opsonização, que ocorre assim que os lipossomas entram em contato com os componentes do sangue. Depois da fagocitose, os lipossomas são degradados por fosfolipases lisossomais e a substância é liberada nos fagolisossomas, podendo se difundir para o citosol ou ser excretada para o meio extracelular. Dessa forma, os lipossomas promovem o direcionamento passivo dos fármacos encapsulados para focos de infecção/inflamação.

Os lipossomas têm sido investigados exaustivamente como veículos para o tratamento da LV (Frezard e Demicheli, 2010). No fim da década de 70, grupos de pesquisa de Londres, Liverpool e Washington mostraram que antimoniais pentavalentes, quando encapsulados em lipossomas convencionais eram 200-700 vezes mais eficazes do que a droga livre, quando administrados em dose única por via endovenosa em modelos experimentais de LV causados por *L.donovani* (Black et al., 1977; New et al., 1978).

Este efeito espetacular dos lipossomas foi atribuído à liberação sustentada do fármaco a partir dos lipossomas para a corrente sanguínea e a tendência natural das vesículas de serem removidas da circulação pelos macrófagos fixos do SFM, principalmente do fígado, baço e medula óssea, onde se localiza o parasito responsável pela infecção visceral. Com efeito, os níveis de antimônio no fígado e no baço de animais foram 5 - 20 vezes mais elevados do que o alcançado pela droga livre e foram mantidos por até 14 dias (Black et al., 1977; Rao et al., 1983). Mais tarde, o forte impacto da encapsulação sobre a eficácia de antimoniais pentavalentes foi confirmado em infecções com *L. infantum* em hamsters e cães (Frézard et al 2000; Valladares et al., 2001; Ribeiro et al., 2008; Da-Silva et al., 2012). O benefício da encapsulação de fármacos em lipossomas convencionais no tratamento da LV foi também demonstrado no caso de vários outros fármacos, incluindo a anfotericina B (Freitas-Junior et al., 2012).

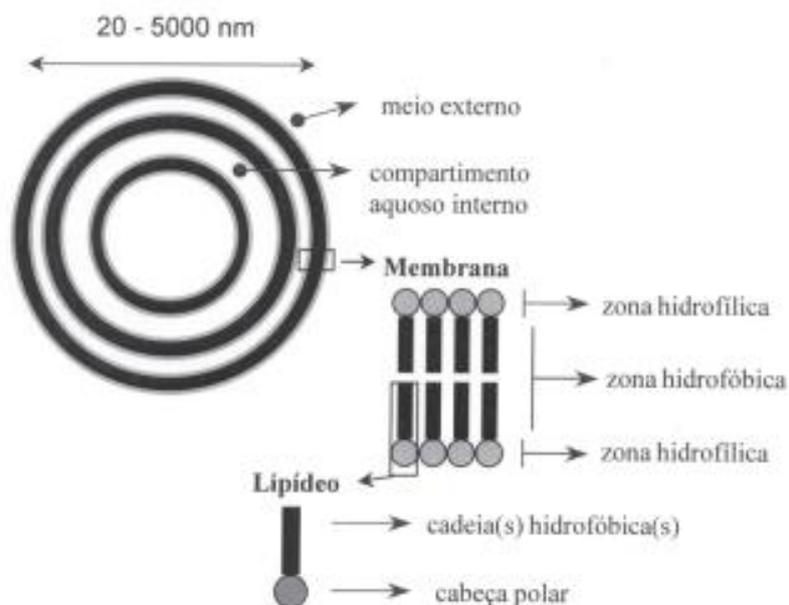


Figura 5: Características estruturais dos lipossomas

Fonte: Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. Quím. Nova vol.28 no.3 São Paulo May/June 2005.

1.9 Fulerol

1.9.1 Estrutura e propriedades físico-químicas

Os fulerenos são nanoesferas formadas puramente de carbono (Figura 6), assim como o diamante e o grafite. Descoberto em 1985, os átomos de carbono na sua estrutura podem ser encontrados organizados em três formas: esférica, elipsóide ou cilíndrica (nanotubos de carbono).

Entretanto, a aplicação tecnológica do fulerenos na área biomédica tem sido limitada pelo caráter hidrofóbico da molécula. A funcionalização química do fulereno permite, além de aumentar a hidrossolubilidade da molécula, a redução da sua citotoxicidade, quando comparado ao fulereno puro. Tal processo é capaz de adicionar várias hidroxilas na superfície do fulereno, gerando um composto denominado fullerol (Takada et al., 2006).

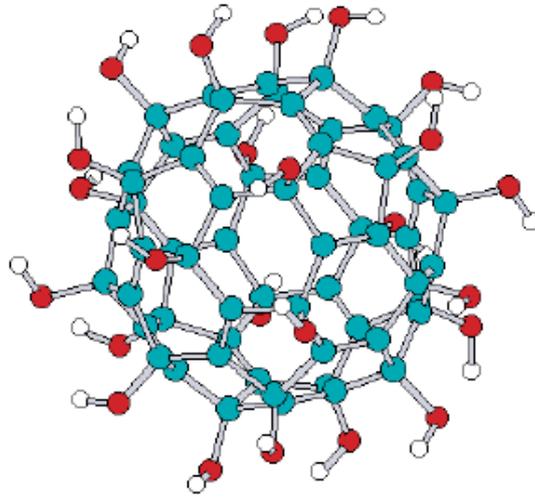


Figura 6: Fullerol $C_{60}(OH)_x$

Fonte: Dordevic, A; Bogdanovic, G. Fullerenol = A new nanopharmaceutic?

Arch Oncol 2008; 16(3-4):42-5

1.9.2 Aplicações dos Fullerenos

Graças a sua forma tridimensional, suas ligações insaturadas e sua estrutura eletrônica, os fullerenos apresentam propriedades físicas e químicas únicas e dentre a vasta gama de aplicações biomédicas dos fullerenos, destacam-se:

- Transporte de drogas de efeito radioterápico e contrastes para diagnóstico por imagem (Magnetic Resonance Imaging - MRI e tomografia por raios-X) (Cagle et al., 1996, 1999; Thrash et al, 1999; Sueki et al., 2003);
- Terapia fotodinâmica (PDT) através da produção de oxigênio singlete e outros radicais livres. (Yamakoshi et al., 2003; Vileno et al., 2004);
- Foto-clivagem do DNA (Higashi et al., 1997);
- Atividade anti-viral, através da inibição do acesso de enzimas virais ao substrato pelo preenchimento da cavidade hidrofóbica dos sítios catalíticos (Zhu et al., 2003);
- Atividade anti-microbiana por intercalação e desestruturação de membranas celulares (Da Ros et al., 1996; Mashino et al., 1999);
- Atividade anti-inflamatória (Yudoh et al., 2009);
- Atividade anti-oxidante e de armadilhas de radicais livres (Lai et al., 1997; Chiang et al., 1995 ; Da Ros e Prato., 1999 ; Tsai et al., 1997);
- Atividade imunomodulatória através do aumento da proliferação de neutrófilos, citocinas, quimiocinas e produção de anticorpos (Vesnina et al., 2012).

Atualmente, as nanopartículas tem aplicações promissoras na medicina, pois uma das suas diversas funções é a interação com o sistema imune modulando sua função, acarretando a uma imunossupressão ou imunoestimulação desse sistema. Composições, tamanhos e a estrutura química das nanopartículas, afetam essas características. Os fulerenos, em particular, os fulerenos polihidroxilados (fuleróis) possuem uma gama de funções, uma delas, atuam na imunomodulação alterando, ora aumentando ora diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α . Em outros estudos, o fullerol mostrou ação no sistema imune inato levando a imunossupressão em alguns animais como peixes (Qing jao et al., 2014).

Segundo Yang e colaboradores, os fulerenos ainda são capazes de ativar células dendríticas, um processo essencial para apresentação de antígenos a células T. Eles são capazes de induzir a expressão na superfície das células de moléculas co-estimulatórias de linfócitos, receptores de quimiocinas, além de citocinas inflamatórias (Bernardes, 2011).

A alta reatividade dos fulerenos com espécies reativas, tais como superóxido, radicais hidroxilados e óxido nítrico, preserva os lipídios, proteínas e DNA das células e outras macromoléculas biológicas dos efeitos do estresse oxidativo. Dessa forma, o fullerol protege os tecidos de danos celulares causados por radicais livres após exposição a substâncias tóxicas pró-oxidantes incluindo alguns fármacos, por “absorver” estes radicais livres que causariam injúrias teciduais e celulares (Srdjenovic et al., 2010; Gharbit et al., 2005). Além disto, os fulerenos destacam-se pela alta estabilidade química e capacidade de promover a expressão gênica de enzimas antioxidantes, contribuindo para a inibição dos danos oxidativos (Jensen, 1996). Nesse contexto, foi descrito também que os fulerenos podem agir como drogas neuroprotetoras em doenças degenerativas relacionadas ao estresse oxidativo (Dordevic e Bogdanovic, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antileishmania do fulerol nas formas livre e encapsulada em lipossomas e o seu efeito hepatoprotetor na quimioterapia antimonial em modelo murino de leishmaniose visceral.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade *in vitro* do fulerol em modelo de macrófago infectado por *Leishmania infantum*;
- Avaliar a eficácia do tratamento com fulerol nas formas livre e encapsulada em lipossomas, em associação ou não com antimoniato de meglumina, em modelo murino de leishmaniose visceral;
- Determinar o impacto do co-tratamento com fulerol na concentração de antimônio no fígado de camundongos submetidos à quimioterapia antimonial;
- Avaliar o impacto do co-tratamento com fulerol encapsulado ou não em lipossomas nas alterações histopatológicas no fígado de camundongos submetidos à quimioterapia antimonial.

3. JUSTIFICATIVA

Leishmaniose é uma doença parasitária endêmica em 98 países no mundo. 90% de casos de LV ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil.

Na prática, na ausência de vacinas, a quimioterapia é inevitável nos casos de LV no homem. Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos na terapêutica antes da segunda guerra mundial e permanecem como base do tratamento da LV na maioria dos países em desenvolvimento (Soares-Bezerra, 2004), como é o caso do antimoniato de meglumina, Glucantime®, no Brasil (Goodwin e Page, 1943). Com relação ao mecanismo de ação, a hipótese mais aceita compreende a conversão do antimonial pentavalente (uma espécie de pró-fármaco) à forma trivalente (Sb (III)) (Frezard e Demicheli, 2009) e a interferência do Sb(III) no metabolismo dos tíóis, o que resulta em estresse oxidativo. Apesar de sua eficácia, estes fármacos possuem desvantagens como administração parenteral, terapia de longa duração (semanas), efeitos sub-ótimos em alguns casos, efeitos colaterais graves, que requer supervisão médica resultando em altos custos, baixa adesão e possíveis falhas no tratamento (Marsden, 1985; Ballou et al., 1987; Chulay e Spencer, 1985; Hepburn et al., 1993).

As limitações atuais dos antimoniais bem como dos outros medicamentos existentes apontam para a necessidade urgente de desenvolver novos fármacos e de aumentar o índice terapêutico dos fármacos disponíveis. Nesse contexto, esforços para aprimorar a terapia antimonial envolvem a veiculação do fármaco em nanossistemas carreadores, a associação com outros medicamentos já em uso e a associação com substâncias capazes de reduzir efeitos colaterais (Frézard e Demicheli 2010; Aguiar et al., 2009).

Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que o antioxidante ácido ascórbico reduz as alterações hepáticas em camundongos, provocadas pelo tratamento com antimoniato de meglumina (Kato et al., 2014). Além disso, importantes ganhos terapêuticos foram demonstrados no uso dos lipossomas como sistema carreador de fármacos antimoniais, no tratamento experimental da LV (Frezard e Demicheli, 2010). Considerando também a capacidade do fulerol de interferir na balança redox dos sistemas biológicos (Dordevic e Bogdanovic, 2008) assim como a sua ação imunomoduladora (Zhu et al., 2008), propomos no presente projeto investigar o fulerol como novo fármaco antileishmania e avaliar seu efeito hepatoprotetor na quimioterapia antimonial em modelo murino de LV. O fulerol será também preparado na forma encapsulada em lipossomas, visando explorar a capacidade dessas vesículas lipídicas aumentarem a permanência da substância encapsulada no

organismo e a direcionarem para sítios específicos, o que pode resultar em aumento de eficácia e redução de toxicidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Hidroxilação do fulereno

O fulerol foi obtido a partir do fulereno (C_{60}), no qual foi funcionalizado quimicamente para solubilização em meio aquoso. A síntese foi realizada no laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, em colaboração com Prof. Dr. Luiz Orlando Ladeira e com o Prof. Dr. Maurício Brant Veloso através de um processo de transferência de fase. Para a hidroxilação do fulereno foram utilizados metanol puro (99,8%) obtido da VETEC Química Fina Ltda, hidróxido de sódio puro (97%) e benzeno puro (99%) proveniente da Labsynth Ltda. O fulereno solubilizado em benzeno (125mg/175ml) é adicionado a uma solução de NaOH (25M). Em seguida é adicionado o hidróxido de tetrabutylamônio (TBAH) (catalisador de transferência de fase). A mistura é agitada magneticamente por 6h. Ao final da mesma, é obtida uma solução concentrada composta de fulerol.

4.2 Preparação das formulações lipossomais contendo Fulerol

Para a preparação dos lipossomas foram utilizados os seguintes fosfolipídios: diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), ambos adquiridos da Lipoid GmbH (Alemanha). O colesterol (COL) foi adquirido da Sigma-Aldrich Co. (Estados Unidos da América).

Lipossomas convencionais contendo fulerol, compostos de DSPC/COL/DPPG, razão molar 5:4:1, foram preparados pelo método de desidratação-reidratação (Mayer et al., 1985). Para isso, uma solução de clorofórmio com os lipídios foi preparada em balão de fundo redondo contendo aproximadamente 20 esferas de vidro de 3mm. A solução foi mantida sob vácuo e aquecimento a 60°C por 60 minutos em rotavapor para completa evaporação do solvente orgânico e formação do filme lipídico. Após isso, houve hidratação com água deionizada na concentração final de lipídeo de 90mM, permanecendo por mais 60 minutos a 60°C no rotavapor sem vácuo. Essa suspensão foi então submetida a 5 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho aquecido a 60°C, respectivamente. Visando reduzir o tamanho das vesículas, a suspensão foi filtrada através de membrana de policarbonato de poro de diâmetro 200nm (Extruder 10-mL, NothernLipidInc, Canadá; GE Whatman) por 5 vezes a 60°C (Nayar et al, 1989). Aos 12 ml da suspensão de lipossomas calibrados, acrescentou-se 12 mL de uma solução de fulerol a 15ug/ml ou de solução de NaCl 0,03M. As misturas foram então separadas em alíquotas de 2mL de lipossomas cada,

congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas ao abrigo da luz por 48 horas e armazenadas a -20°C. No dia da administração, o liofilizado foi reconstituído com água e salina nas seguintes condições: Cada alíquota de 2mL foi reidratado com 0,4mL de água deionizada, seguido de 0,4 mL de solução de NaCl a 0,15M, mantida em banho a 60°C por 30 minutos sendo homogeneizado a cada 10 minutos e completado até 2mL de solução NaCl 0,15M. Visando calibrar o tamanho das vesículas, a suspensão foi finalmente extrusada 5 vezes em membrana de policarbonato de poro de diâmetro 200nm a 60°C.

Os lipossomas contendo fulerol, bem como seu controle (lipossomas vazios), tiveram sua distribuição de tamanho avaliada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando o equipamento Zetasizer (DLST1 Malvern, Reino Unido) alocado no Laboratório de Sistemas Nano Estruturados, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB - UFMG.

4.3 Testes *in vitro* de citotoxicidade e de atividade antileishmania

4.3.1 Ensaio de citotoxicidade

Os macrófagos foram isolados de camundongos BALB-c (provenientes do CEBIO, ICB/UFMG), 3 dias após injeção intraperitoneal de tioglicolato 3%, por lavagem peritoneal com meio RPMI gelado. As células foram lavadas, contadas e uma suspensão resultante de densidade de 1×10^6 células/mL foi obtida. As células foram mantidas a 37°C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina (50 µg/mL) e penicilina (1000 U/mL). Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^3 células/poço e esperou-se a ocorrência de sua aderência. No dia seguinte, as células foram expostas aos compostos Glucantime e fulerol (0,12mg/ml) Gluc (5 mM de Sb) e mantidas a 37 °C em incubadora umidificada e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 72 horas de exposição ao fulerol e glucantime, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-. difenil-tetrazolium bromidietiazolil azul (MTT- 5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e aguardou-se 4 horas. O ensaio de MTT é baseado na redução do tetrazolium, resultando na formação de formazan pela ação de monoxigenases mitocondriais (Mosman, 1983). Após a formação de cristais de formazan, estes foram solubilizados em DMSO e lidos em leitor de Elisa a 570 nm. Os resultados foram mostrados como valores de absorbância e controles (não exposto ao antimonial e/ou fulerol).

4.3.2 Atividade no modelo de macrófago infectado com *Leishmania*

Para o teste de atividade *in vitro*, os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos BALB/c, como descrito acima (item 4.3.1).

Em seguida as células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas esféricas em cada poço, na densidade de 5×10^3 células/poço e esperou-se a ocorrência de sua aderência. Foi feita então a lavagem para a retirada dos macrófagos não aderentes e acrescentou 1×10^3 de células promastigostas BH46. Esperou-se 4 horas para a infecção e iniciou-se o tratamento com concentrações crescentes de glucantime e uma concentração de fulerol (0,12mg/ml). As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 72 horas de exposição ao fulerol e glucantime, as lamínulas foram retiradas e coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E), montadas em lâminas e analisadas em microscópio óptico (Olympus BX41). Os resultados foram expressos como Índice de Infecção obtido pela seguinte fórmula: (% de macrófagos infectados) x (amastigotas/macrófagos infectados)/100 (Marques-da-Silva et al., 2011).

4.4 Tratamento sub-agudo com fulerol e/ou antimonial de camundongos infectados com *L. infantum* e avaliação de eficácia

Para os testes de eficácia, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com idade de 6-8 semanas e peso de 20-25g provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG - CEBIO. Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG - CETEA/UFMG, conforme protocolo nº 46/2013.

4.4.1 Infecção

Os animais foram infectados pela via intraperitoneal com inóculo de $2,1 \times 10^7/100\mu\text{L}$ promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1970/BH46). As células foram retiradas da criopreservação do banco de cepas do laboratório de Biologia de *Leishmania* e mantidas em meio essencial mínimo de cultura (α -MEM, Gibco, Invitrogen, NY, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Multicell, Wisent Inc. Québec, CA), 100 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e incubadas a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e pH 7,0 em estufa B.O.D. (Model: 2005, Jonhs Scientific-VWR, Toronto, CA). As promastigotas foram cultivadas em frascos para cultura de células de 25mL (Corning, NY, EUA) inicialmente com um inóculo de 10^6 células/mL e

repicadas em fase estacionária de crescimento, duas vezes por semana. A curva de crescimento foi realizada com inóculo inicial de 10^6 promastigotas/mL em meio de cultura α -MEM em garrafas de 25mL (Corning, NY, EUA), pela contagem do número de promastigotas desde o tempo zero de inoculação até o décimo segundo dia de crescimento em câmara hemocitométrica de Neubauer. Os parasitos eram diluídos convenientemente em solução de Isoton (ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,12 M, formaldeído 0,5%, pH 7,2). O número de células/mL de cada amostra foi estimado como a média aritmética de duas contagens dos quatro quadrantes da câmara, multiplicado pelo inverso da diluição da amostra e por 10^4 (fator de correção da câmara). Foi feita uma curva número de parasitas vs. tempo de avaliação – partindo do inóculo inicial – e sua análise por regressão não linear para definição das fases de crescimento da cepa analisada – Prisma GraphPad.

4.4.2 Tratamento

O estudo consistiu de três experimentos. O primeiro experimento teve como intuito avaliar a eficácia e o efeito hepatoprotetor do fulerol livre em associação com glucantime. No segundo procurou avaliar a eficácia e efeito hepatoprotetor do fulerol encapsulado em lipossomas em associação com Glucantime. No terceiro experimento, foi avaliada a eficácia de diferentes doses do fulerol encapsulado em lipossomas.

Em todos os experimentos, o tratamento iniciou-se 7 dias após inoculação da cepa BH46 e teve duração de 20 dias.

No 1º experimento, os animais foram alocados em 4 grupos experimentais (n = 6 por grupo) que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1: tratado com a forma comercial do antimonial (glucantime) na dose de 120mg Sb/kg/dia por via IP;

Grupo2: tratado com o fulerol livre na dose de 0,05mg/kg/dia por via IP;

Grupo 3: tratado com a associação glucantime e fulerol. O fulerol (0,05mg/kg/dia) foi administrado 15 minutos antes da administração do glucantime (120mg Sb/kg/dia), ambos, por via IP;

Grupo 4: recebeu apenas salina intraperitoneal.

No 2º experimento, os animais foram alocados em 6 grupos experimentais (n = 6 por grupo) que receberam os seguintes tratamentos:

- Grupo 1:** tratado com o glucantime (120mg Sb/kg/dia);
- Grupo2:** tratado com o fulerol livre (0,05mg/kg/4dias);
- Grupo 3:** tratado com glucantime (120mg Sb/kg/dia) associado ao fulerol livre (0,05mg/kg/4 dias). O fulerol foi administrado 15 minutos antes da administração do glucantime, ambos, por via IP;
- Grupo 4:** tratado com glucantime (120mg Sb/kg/dia) associado ao fulerol encapsulado em lipossomas (0,05mg/kg/4 dias). O fulerol foi administrado 15 minutos antes da administração do glucantime, ambos, por via IP;
- Grupo 5:** tratado com fulerol encapsulado em lipossomas (0,05mg/kg/4 dias);
- Grupo 6:** recebeu salina.

No 3º experimento, os animais foram alocados em 6 grupos experimentais (n = 6 por grupo) que receberam os seguintes tratamentos:

- Grupo 1:** tratado com o glucantime (120mg Sb/kg/dia);
- Grupo2:** tratado com o fulerol livre (0,05mg/kg/4dias);
- Grupo 3:** tratado com fulerol encapsulado em lipossomas (0,05mg/kg/4 dias);
- Grupo 4:** tratado com fulerol encapsulado em lipossomas (0,2mg/kg/4 dias);
- Grupo 5:** tratado com solução de lipossomas vazio (branco);
- Grupo 6:** recebeu salina.

Ao final do tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, após sedação com 75mg/kg cetamina e 5mg/kg de xilazina via IP. Órgãos como coração, rins, fígado e baço foram coletados para utilização nos protocolos de determinação de carga parasitária por PCR quantitativa (qPCR) (Bretagne, et al., 2011), doseamento de antimônio e avaliação histológica.

4.4.3 Avaliação de carga parasitária

A carga parasitária foi avaliada pela técnica de PCR quantitativa (qPCR) (Bretagne, et al., 2011).

4.4.3.1 Extração de DNA pelo método fenol-clorofórmio

O método utilizado para purificação do DNA foi a extração com fenol-clorofórmio (Ausubel et al, 1996). Os órgãos coletados dos animais (baço e fígado) foram triturados em maceradores de vidro. Do homogenato total resultante, foram separadas alíquotas de 200mg

de baço e fígado às quais acrescentaram-se 500µL de solução de Lise (EDTA, Solução de NaCl 5M e SDS 10%) e 20µL de Proteinase K [20mg/ml] obtida da Sigma-Aldrich) para cada amostra e incubados por 14 horas a 37°C. Após a adição de fenol as amostras foram homogeneizadas por 10 minutos por inversão (manual) e em seguida centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm. O processo foi repetido 1x. Depois, utilizou-se clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 observando os mesmos cuidados anteriores seguidos de centrifugação (5 minutos a 3000 rpm). Após isso, houve a precipitação do DNA com álcool absoluto 95% gelado. Após evaporação do etanol, as amostras foram ressuspensas com água mili-q estéril e o DNA total foi dosado no leitor de ELISA Nan142. Todas as amostras foram então diluídas para a concentração final de 5ng/µL.

4.4.3.2 Determinação da carga parasitária por qPCR

O ensaio para quantificar a carga parasitária nas amostras de baço e fígado dos animais foi realizado utilizando 1µL dos iniciadores na concentração de 2µM, 5µL de SYBR™ Green e 4µL de DNA Total (20µg), perfazendo um volume final de 10µL de reação. O ensaio foi realizado em duplicata. Os valores de *baseline* e *threshold* utilizados foram ajustados para 3-15 ciclos referente à *baseline* e de 0,2 para *threshold*. A carga parasitária foi estimada utilizando primer específico para sequência multicópia de KDNA (Forward: 5' CCTATTTTACACCAACCCCA 3'; Reverse: 5' GGGTAGGGGCGTTCTGCGAA 3') de *Leishmania infantum*. As amostras foram processadas e analisadas no equipamento ABI Prism 7500 Sequence Detection System (SDS Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem foram as seguintes: 95°C por 10 minutos para desnaturação inicial seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão). Os valores obtidos de cycle threshold (Ct) foram utilizados para calcular a carga parasitária utilizando uma curva padrão a partir do DNA genômico de *Leishmania infantum* e expressos em número de parasitos por ng de DNA Total.

4.5 Doseamento hepático de Sb

A concentração de antimônio foi determinada através da técnica de espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite (espectrômetro AA600 - ETASS) da Perkin-Elmer de acordo com Schettini et al., 2006). Fragmentos do fígado foram macerados com dois terços de sua massa em tampão PBS. Após homogeneização, 200mg do homogenato foi pesado e submetido a digestão com 1mL de ácido nítrico (65%) por 45 minutos na temperatura de 90°C

em bloco digestor (Dryblock 4004 Marconi®). Após isso, acrescentou-se 450µL de peróxido de hidrogênio (30%) mantido sob aquecimento a 90°C por 30 minutos. Após atingir a temperatura ambiente as amostras foram ressuspensas em ácido nítrico 0,2% em balão volumétrico até o volume final de 5mL. A quantidade de Sb por massa do fígado foi calculada utilizando a massa inicial da amostra digerida antes da digestão. O método analítico foi previamente validado mostrando o limite de quantificação de 0,93µg de Sb por grama de órgão (Fernandes et al., 2013).

4.6 Análises histopatológicas

4.6.1 Hematoxilina- Eosina

Fragmentos de fígado, baço e rins obtidos dos animais foram recortados em porções representativas e fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas, em seguida, inseridos em álcool 70%, desidratados em soluções crescentes de álcool até álcool absoluto. Diafanizados em xilol e embebidos em parafina histológica. Depois, foram seccionados a 5 micrômetros utilizando micrótomo MICRON colocados em lâminas e levados à estufa para secagem e fixação do tecido à lâmina. As lâminas foram então coradas com H&E para avaliação microscópica de lesões (Ridley, 2003) (figura 7). Realizamos a determinação mínima de 15 campos independentes por lâmina de cada órgão de animal analisadas em objetivas de 40x para determinar alterações histopatológicas utilizando o microscópio de luz Olympus BX 41 e o programa ImagePro-Plus. Imagens digitalizadas foram obtidas através da câmera digital (Q-Color; Olympus) acoplada ao microscópio Olympus BX41.

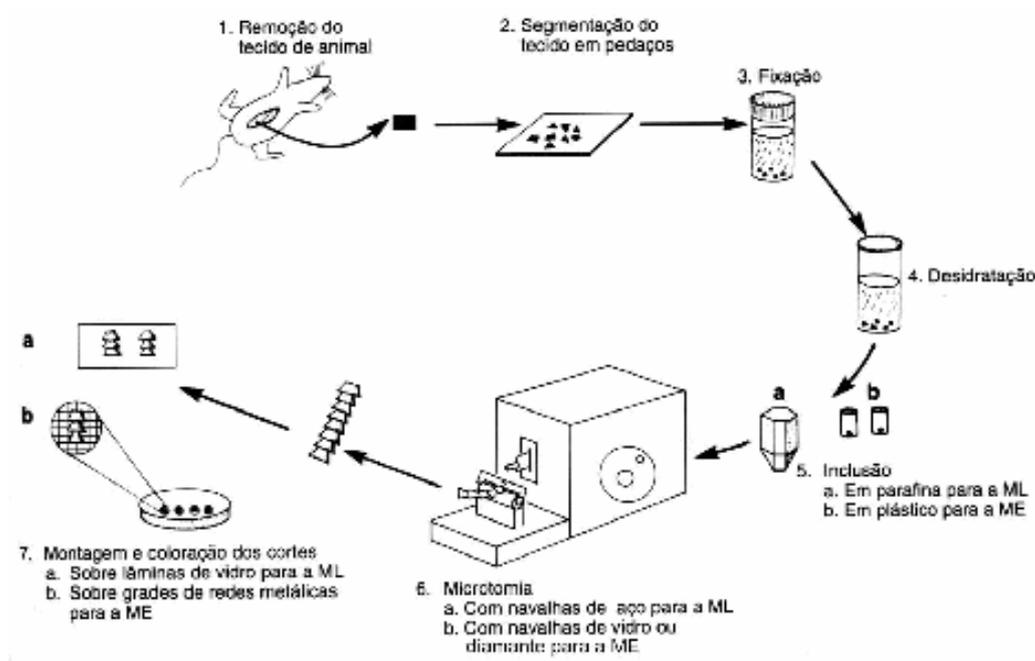


Figura (7): Representação das técnicas utilizadas para o processamento histológico

Fonte: MICHALANY, J., 1980. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 276p.

4.6.2 Índice Apoptótico

O índice apoptótico (IA) foi realizado primeiramente sob um *screening* das lâminas atentando para mudanças morfológicas das células coradas em H&E. 15 campos de cada lâmina foram avaliados aleatoriamente (aumento de 40x), selecionando a região central. Áreas de necrose foram utilizadas como parâmetro de exclusão das áreas analisadas. Foi considerado positivo para apoptose, células que apresentaram critérios morfológicos: (1) anoikis (célula contraída que perde a adesão de células adjacentes); (2) condensação nuclear (condensação da cromatina); (3) fragmentação nuclear e da membrana citoplasmática (sem cariorexis ou ruptura); e (4) formação de corpos apoptóticos resultando em fragmentação celular. O cálculo para IA foi: número de células com características de apoptose/número das células totais. Utilizou-se Sigma Sem Pro 5 imaging program (Soini et al., 1998; Jensen, 1996). Através de um ensaio colorimétrico mais específico, a presença de corpos apoptóticos foi avaliada também por análise semi-quantitativa da fragmentação de DNA através da técnica de TUNEL (Terminal dUTP nick end labeling) utilizando o Kit comercial (FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Colorimetric-Calbiochem®) (Figura 13) (Gavrieli,

1992). Essa técnica consistiu na fixação do fígado em solução de formalina 10% e inclusão em parafina, desparafinização em xilol, desidratação em soluções alcoólicas e incubação por 10 minutos em tampão fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, e 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Os cortes foram incubados em solução de proteinase K (20 µg/mL) (2 mg/mL proteinase K em 10 mM Tris, pH 8) por 15 minutos a temperatura ambiente (TA) e lavados em tampão salina Tris (TBS, 150 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7,4) por 5 minutos. Peroxidase endógena foi inativada pela incubação por 5 minutos a com solução de 3% de peróxido de hidrogênio (10 µl 30% H₂O₂ com 90 µl metanol) por 5 min a TA, lavadas posteriormente com dois banhos de TBS por 5 min, e re-incubadas por 20 min a TA em tampão de equilíbrio (1M cacodilato de sódio, 0,15 M Tris, 1,5 mg/mL BSA, 3,75 mM CoCl₂, pH 6,6). Os cortes foram incubados em câmara úmida a 37°C por 2 h com TRT (terminal deoxynucleotidyl transferase) e nucleotídeos e subsequentemente incubadas em tampão de bloqueio (4% BSA em PBS) por 5 min a TA. Após lavagem com TBS por 5 min, os cortes foram incubados com peroxidase-estreptavidina conjugada em câmara úmida e TA por 1 h. Após lavagem por 5 min com TBS, DAB foi adicionado seguida de incubação por 10 min a TA, após diluição indicada pela fabricante (diaminobenzidina (DAB), 0,7mg/comprimido). Os cortes foram lavados em água de torneira e corados com metilgreen por 3 min. Finalmente, desidratados e montados com resina sintética Permount. A Figura 8 esquematiza os procedimentos acima descritos. Os hepatócitos foram considerados como positivos pelo TUNEL quando apresentaram características de núcleo apoptótico e marcação em marrom escuro. Além da marcação marrom, as células devem apresentar os seguintes critérios morfológicos estabelecidos no item anterior com coloração H&E: (1) anoikis (célula contraída que perde a adesão de células adjacentes); (2) condensação nuclear (condensação da cromatina); (3) fragmentação nuclear e da membrana citoplasmática (sem cariorexis ou ruptura); e (4) formação de corpos apoptóticos resultando em fragmentação celular. Núcleos sem marcação marrom foram considerados negativos e os resultados foram expressos como porcentagem do total de hepatócitos, excluindo áreas de necrose. O índice apoptótico (IA = total número de células com características de apoptose/ número de células total × 100) determinados em 15 campos por lâmina utilizando o programa Image Pro-Plus.

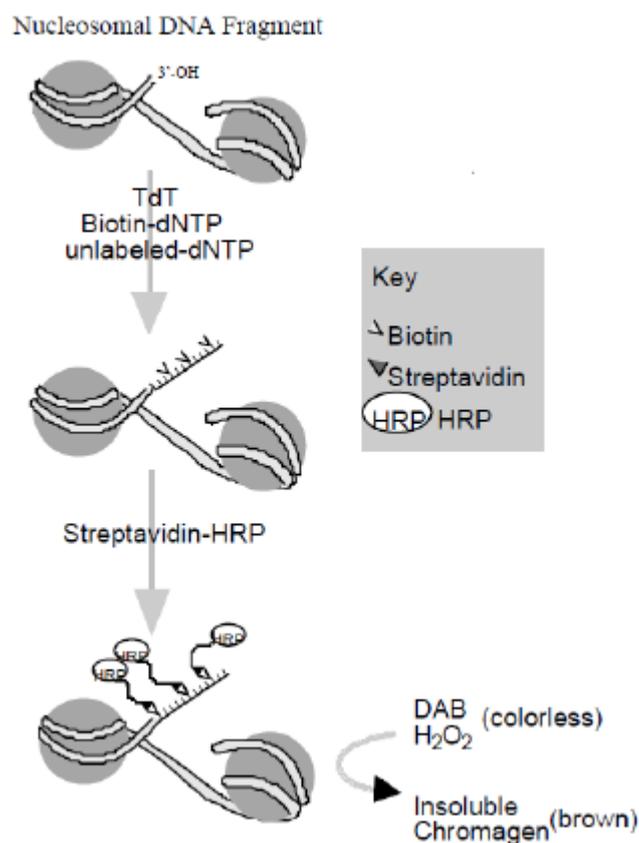


Figura 8: Esquema representativo da técnica de TUNEL

Fonte: Fragel DNA Fragmentation Detection Kit, Colorimetric-Calbiochem®)

4.7 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos resultados entre os diferentes grupos foi utilizado o software Prism 5.0. Utilizou-se análise de variância One-Way ANOVA com pós teste Bonferroni para análises paramétricas ou Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's para análises não paramétricas. As diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Características da formulação de fulerol em lipossomas

Conforme resultados de caracterização, podemos ver que o diâmetro médio encontra-se em torno de 200nm, que a população de lipossomas é monodispersa (homogênea em tamanho) evidenciado pelo Índice de Polidispersão (IPI) menor que 0,2 e que o potencial zeta é negativo.

Tabela 1: Distribuição do tamanho e potencial zeta de partículas nas formulações de Lipossomas em solução NaCl 0,15M. Os valores representam as médias e respectivos desvios-padrão (n=5).

Amostras	Diâmetro médio (nm) e DP	(IPI) e DP
Fulerol Lipo 0,05	192±15	0,048±0,03
Fulerol Lipo 0,2	211 ±21	0,056±0,01
Lipo Vazio	196±2	0,051±0,02

Tabela 2: Potencial Zeta das formulações de lipossomas

Amostras	Potencial Zeta (mV)
Fulerol Lipo 0,05	-54,26
Fulerol Lipo 0,2	-53,58
Lipo Vazio	-54,25

Observa-se que a presença do fulerol na formulação não interferiu nas características de tamanho e potencial zeta das vesículas. Sugere-se, então, uma ausência de interação do fulerol com a superfície de membrana.

5.2 Atividade antileishmania do fulerol em modelo de macrófago infectado por *Leishmania*

Este estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, avaliou-se a faixa de concentração citotóxica do fulerol em macrófagos peritoneais. Na segunda etapa, investigou-se a atividade antileishmania do fulerol em concentração não citotóxica para os macrófagos.

5.2.1 Citotoxicidade do fulerol em macrófagos peritoneais

Com o intuito de averiguar a toxicidade do fulerol em macrófagos peritoneais, foi avaliado o efeito de concentrações crescentes sobre a viabilidade celular através da técnica de MTT. Como mostrado na figura 09, até a concentração de 0,12mg/ml de fulerol, não há efeito na viabilidade celular. Em contrapartida, a partir de 0,15mg/ml o valor de absorbância começa a decrescer significativamente indicando diminuição da viabilidade celular. Este dado nos permite saber que a concentração máxima de fulerol a ser usada sem causar dano celular é de 0,12mg/ml.

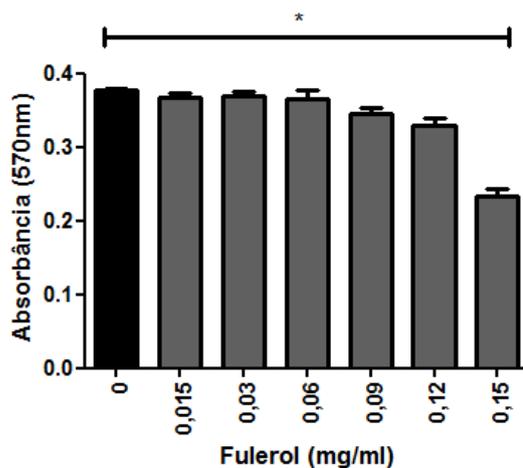


Figura 09: **Viabilidade de macrófagos peritoneais expostos ao fulerol.** A viabilidade celular foi representada através de valores de absorbância pós 72 horas de exposição a concentrações crescentes de fulerol.* $p < 0,05$ = diferença significativa em relação ao grupo controle (0). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

5.2.2 Atividade antileishmania *in vitro*

Para avaliar a atividade antileishmania do fulerol, este foi utilizado em concentração máxima não citotóxica em um modelo de macrófago infectado por *Leishmania infantum* (cepa BH46). Ademais, o fulerol foi também avaliado em associação com o fármaco antimonial padrão (glucantime) a fim de observar um possível efeito aditivo dos dois compostos na atividade antileishmania. Como demonstrado na figura 10, o fulerol sozinho conseguiu reduzir a carga parasitária em cerca de 75% quando comparados ao grupo controle (barra escura). Todavia, não foi possível observar um efeito aditivo no grupo que recebeu a associação fulerol e glucantime, por não mostrar carga parasitaria significativamente menor que os grupos que receberam os fármacos isoladamente. A prancha apresentada na figura 11 mostra micrografias representativas de cada grupo. Nota-se que o grupo tratado com fulerol a 0,12mg/ml (D) apresentou uma redução da quantidade de amastigotas no interior dos macrófagos quando comparado ao grupo não tratado (A).

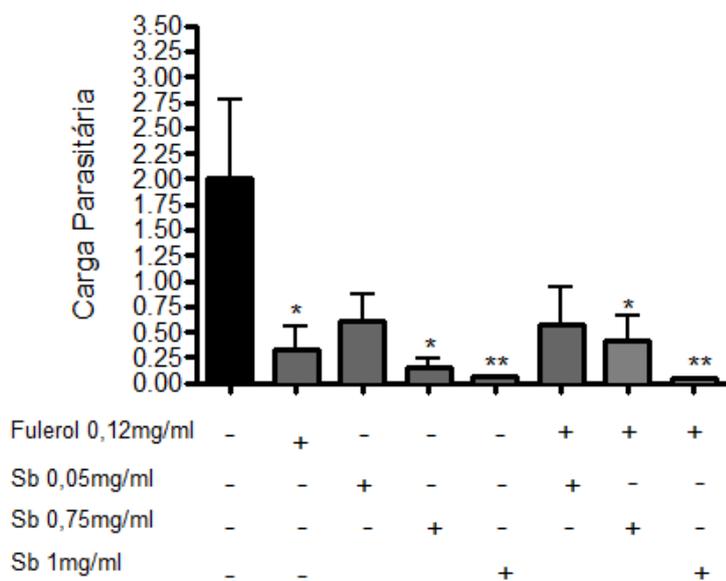


Figura 10: **Atividade antileishmania *in vitro* do fulerol associado ou não ao glucantime.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais infectados com amastigotas da cepa BH 46 (*L. infantum*) 72 horas após exposição ao Glucantime (0,05mg/ml, 0,75mg/ml ou 1 mg/ml), fulerol 0,12mg/ml ou associação com as respectivas concentrações do antimonial. Os dados são mostrados como medias \pm EP. * $p < 0,05$ = diferença significativa em relação ao grupo não tratado. Análise com One-Way ANOVA com pós teste Bonferroni e ** $p < 0,01$ Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

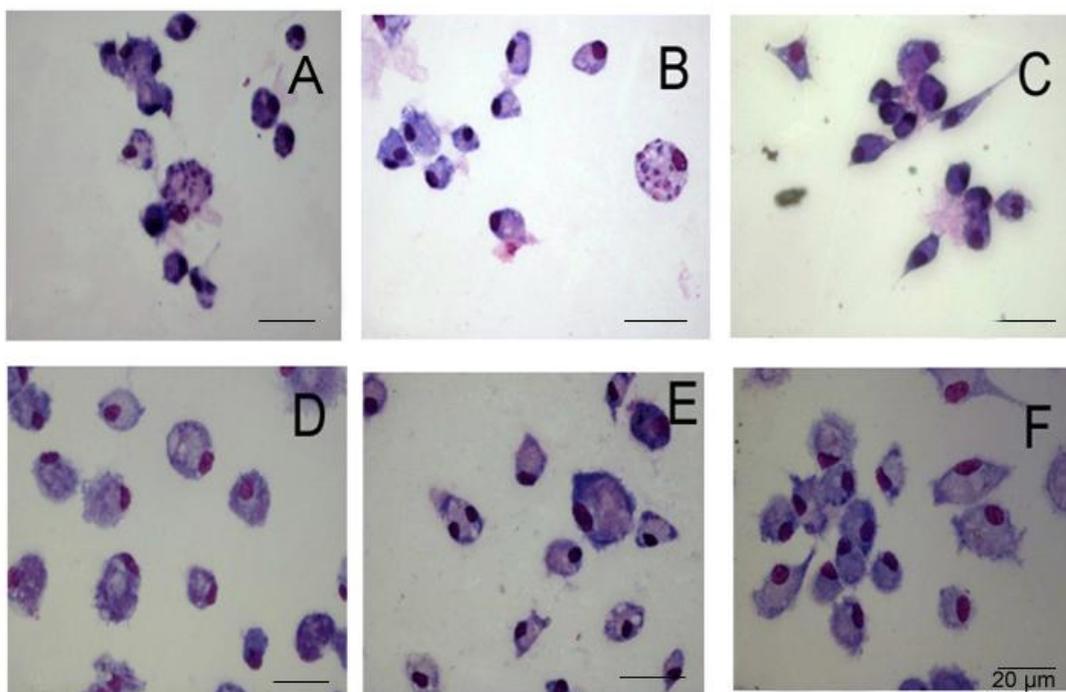


Figura 11: **Micrografias ilustrativas de macrófagos peritoneais infectados com *L. infantum* submetidos a diferentes tratamentos por 72 horas.** A – Não tratado, B – Glucantime 0,75mg/ml, C - Glucantime 1mg/ml, D- Fulerol 0,12mg/ml, E - Glucantime 0,75mg/ml associado ao Fulerol 0,12mg/ml, F - Glucantime 1mg/ml associado ao Fulerol 0,12mg/ml. Coloração em Giemsa.

5.3 Atividade antileishmania *in vivo* do fulerol na forma livre ou encapsulada em lipossomas em modelo murino de LV

5.3.1 Atividade do fulerol livre e encapsulado em lipossomas

Objetivando avaliar a atividade antileishmania do fulerol em modelo murino de LV, camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* receberam 4 doses de fulerol livre (0,05 mg/kg/4 dias) ou encapsulado em lipossomas (0,05 mg/kg/4dias e 0,2 mg/kg/4 dias) por via intraperitoneal e a carga parasitária foi determinada por PCR quantitativa no fígado e no baço dos animais. Os grupos controle receberam salina (controle negativo) ou Glucantime na dose de 120 mg/kg/dia por 20 dias (controle positivo).

As figuras 12 (A e B) e 13 mostram os resultados da carga parasitária no fígado e baço, respectivamente. Nas figuras 12A e 13 podemos observar uma redução significativa da carga parasitária tanto no fígado quanto no baço, nos grupos tratados com fulerol encapsulado em lipossomas (0,05mg/kg/4 dias)e com glucantime, quando comparados ao grupo salina. É

também interessante notar que o fulerol livre não promoveu redução significativa da carga parasitária e que a forma encapsulada foi significativamente mais efetiva que a forma livre. O aumento da dose de fulerol lipossomal de 0,05 para 0,2 mg/kg resultou em redução mais pronunciada da carga parasitária (Figura 13), sendo que não foi possível detectar o parasito no fígado dos animais dentro o limite de detecção do método de PCR (Figura 12B).

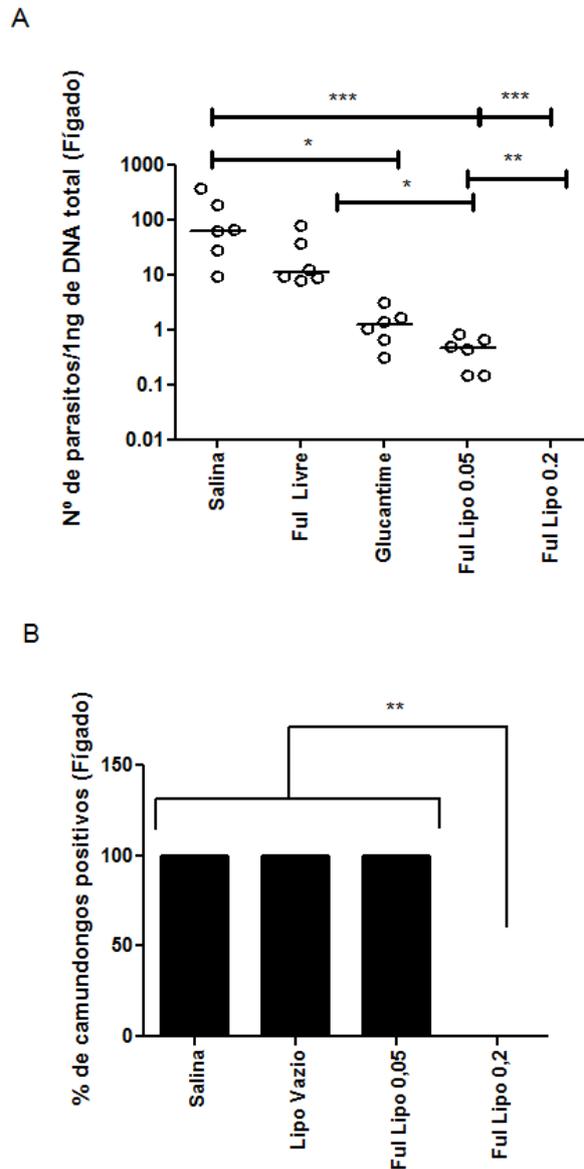


Figura 12: **Atividade antileishmania do fulerol livre e encapsulado em lipossomas no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*.** Em A, carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* determinada por PCR quantitativa, após 20 dias de tratamento por via intraperitoneal com Glucantime (120 mg Sb/kg/dia), fulerol livre (0,05 mg/kg/4 dias) e fulerol encapsulado em lipossomas (0,05 mg/kg/4 dias). As barras representam as medianas da carga parasitaria (n = 6). *P< 0,05 e *** p<0,0001 teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Em B, proporção de camundongos com fígado positivo para *Leishmania* por PCR. ** p<0,05 no teste exato de Fischer.

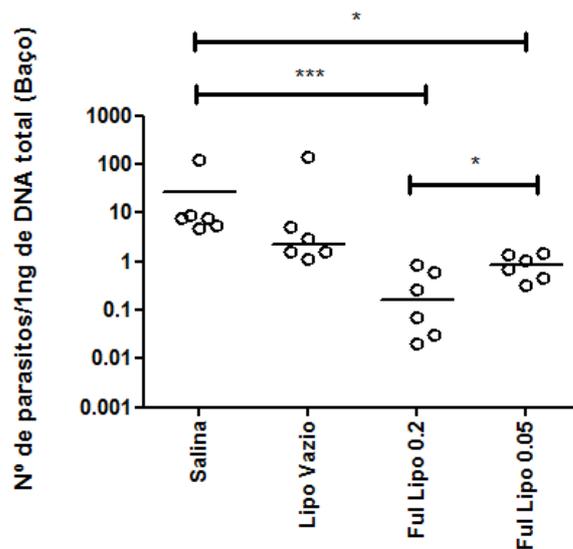


Figura 13: **Atividade antileishmania do fulerol livre e encapsulado em lipossomas no baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*.** Carga parasitária no baço dos animais tratados com salina, Fulerol lipossomal (0,2mg/kg/4dias e 0,05mg/kg/4dias) e lipossomas vazios (mesma dose de lipídeo que nos grupos recebendo o fulerol encapsulado). As barras representam as medianas da carga parasitaria (n = 6). *P< 0,05 e *** p<0,0001, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn´s

5.3.2 Eficácia do fulerol em associação com glucantime

Como o fulerol se mostrou eficaz em reduzir a carga parasitária, avaliou-se então se a associação do fulerol e glucantime poderia promover um efeito aditivo numa terapia combinada.

Num primeiro experimento, ambos, o fulerol livre e o glucantime foram administrados no modelo murino de LV com doses diárias IP, separadamente ou conjuntamente, por um período de 20 dias.

Como mostrado na Figura 14, a carga parasitária no fígado foi significativamente reduzida nos grupos que receberam fulerol, glucantime e a associação do glucantime com fulerol, quando comparada aquela do grupo controle. Por outro lado, não houve diferença significativa na carga parasitária entre os grupos tratados, o que indica a ausência de efeito aditivo significativo dos fármacos. Por outro lado, esse experimento comprova também que fulerol livre apresenta atividade antileishmania quando administrado com doses diárias.

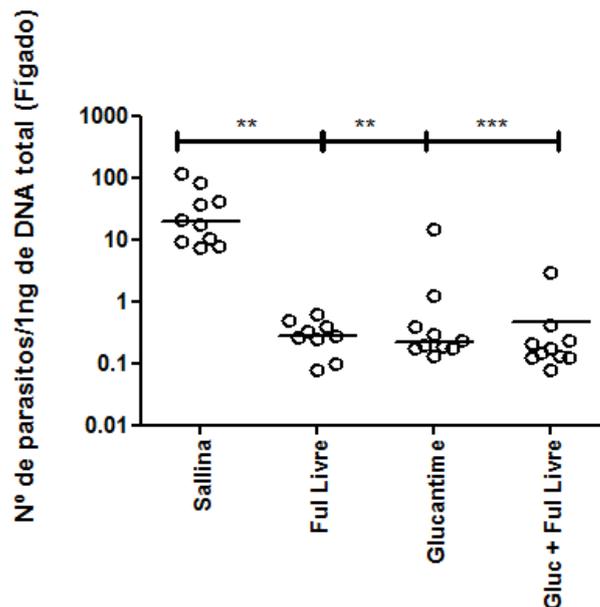


Figura 14: **Eficácia do tratamento combinado com fulerol e glucantime em modelo murino de LV.** Carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* determinada por PCR quantitativa, após 20 dias de tratamento por via intraperitoneal com doses diárias do Glucantime (120mg Sb/kg/dia), fulerol (0,05mg/kg/dia), dos dois fármacos e salina. As barras representam as medianas da carga parasitaria (n = 6). **p<0,01 e ***P< 0,0001 com relação ao grupo salina; teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

Num segundo experimento, avaliou-se a eficácia do tratamento combinado com fulerol lipossomal e glucantime no mesmo modelo experimental, sendo que o fulerol foi dado com intervalo de 4 dias e o glucantime com doses diárias. Este tratamento foi comparado com os tratamentos separados e o tratamento com fulerol livre em associação ou não com glucantime.

A Figura 15 mostra os resultados da carga parasitária no fígado dos animais. Como esperado, o fulerol administrado na sua forma livre (não encapsulada) no intervalo de 4 dias, não reduziu significativamente a carga parasitária quando comparado ao grupo salina. Contudo, uma redução significativa da carga parasitária foi observada nos grupos tratados com o glucantime associado ou não com fulerol, tanto na sua forma livre, quando na encapsulada em lipossomas. Todavia, não foi possível evidenciar uma eficácia significativamente maior do tratamento combinado com relação aos tratamentos individuais.

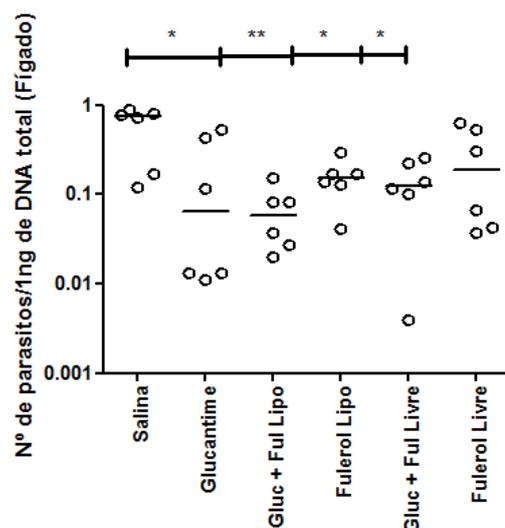


Figura 15: **Eficácia do tratamento combinado com fulerol lipossomal e glucantime em modelo murino de LV.** Carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, determinada por PCR quantitativa, após 20 dias de tratamento por via intraperitoneal com fulerol encapsulado em lipossomas (0,05 mg/kg/4 dias), glucantime (120 mg Sb/kg/dia), glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + fulerol (0,05 mg/kg/dose/4 dias), glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + fulerol em lipossomas (0,05 mg/kg/dose/4 dias) ou salina. As barras representam as medianas da carga parasitaria (n = 6). *p< 0,05 e **p<0,01 com relação ao grupo salina, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

5.3.3 Captação hepática de Sb

Nos tratamentos combinados que associam o fármaco antimonial ao fulerol encapsulado ou não em lipossomas, investigamos se o fulerol poderia interferir na captação hepática de Sb. A Figura 16 mostra os resultados da quantificação de Sb no fígado dos camundongos infectados após tratamento com glucantime e as associações glucantime + fulerol livre ou glucantime + fulerol lipossomal. Em A, o fulerol administrado todos os dias não interferiu significativamente na captação de Sb, mesmo observando uma tendência para uma menor captação de Sb no grupo que recebeu o fulerol. Em B, o fulerol administrado com intervalo de 4 dias também não promoveu alteração significativa na captação de Sb, mesmo observando uma tendência para uma menor captação de Sb no grupo que recebeu a formulação lipossomal.

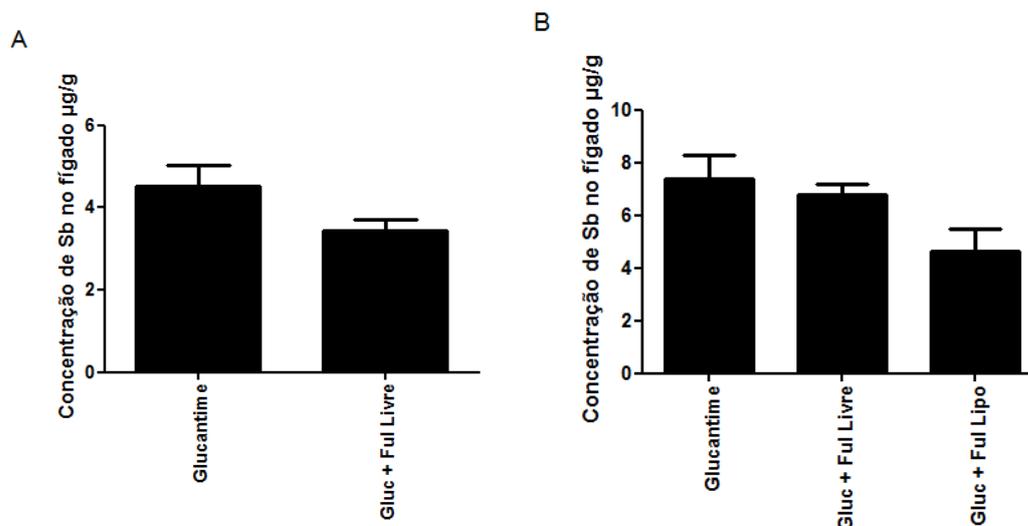


Figura 16: **Efeito do co-tratamento com Fulerol na forma livre ou encapsulada em lipossomas na captação hepática de Sb após quimioterapia antimonial.** Em A, concentração hepática de Sb após 20 dias de tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, com doses diárias IP de Glucantime 120mg/kg/dia e Glucantime 120mg/kg/dia em associação com fulerol livre 0,05mg/kg/dia. Em B, concentração de Sb após 20 dias de tratamento IP, com doses de fulerol 0,05 mg/kg/4dias, Glucantime 120mg/kg/dia, Glucantime120mg/kg/dia em associação com fulerol livre 0,05mg/kg/4dias e Glucantime 120mg/kg/dia associado a Fulerol encapsulado em lipossomas 0,05 mg/kg/4dias. Os resultados são mostrados como médias± EP.

5.4 Alterações histopatológicas e citotoxicidade no tecido hepático

5.4.1 Denegação Hidrópica

Considerando a elevada toxicidade do glucantime e a potente ação antioxidante do fulerol, uma outra avaliação realizada nos estudos de eficácia em modelo murino de LV foi se o co-tratamento com fulerol seria capaz de reduzir a toxicidade do glucantime. Neste caso, foram usadas as alterações hepáticas (degeneração hidrópica e aumento do índice apoptótico) como indicadores de toxicidade, já que foram evidenciadas previamente em modelo murino de LV submetidos à quimioterapia antimonial (Kato et al., 2014).

A Figura 17 (A e B) mostra um aumento significativo na porcentagem de áreas lucentes no fígado dos animais tratados com glucantime, quando comparado ao grupo salina. Em A, o fulerol administrado diariamente em associação com glucantime promoveu uma redução significativa na proporção de áreas lucentes são níveis próximos do grupo controle.

Em B, a administração do fulerol com intervalo de 4 dias só foi efetiva na redução da proporção de áreas lucentes, quando na forma encapsulada em lipossomas.

As figuras 18 e 19 mostram pranchas representativas do gráfico anterior (Fig. 17). Nota-se um intensa turgência nos hepatócitos tratados com glucantime (Fig. 18A). Em B, há uma diminuição dessa alteração, como consequência do co-tratamento com fulerol 0,05mg/kg/dia. Em C e D que receberam fulerol e salina respectivamente, observamos aspectos típicos de células hepáticas. Na figura 19, temos a representação morfológica dos hepatócitos do grupo que recebeu fulerol nas formas livre e encapsulada em lipossomas com intervalo de 4 dias. Uma intensa turgência na área dos hepatócitos é observada em A (grupo glucantime). Em C, o fulerol na forma livre manteve o mesmo padrão de intensa turgência celular. Todavia, essa alteração foi revertida no grupo que recebeu o fulerol encapsulado em lipossomas. Este dado nos mostra o efeito hepatoprotetor do antioxidante encapsulado em lipossomas na quimioterapia antimonial da LV.

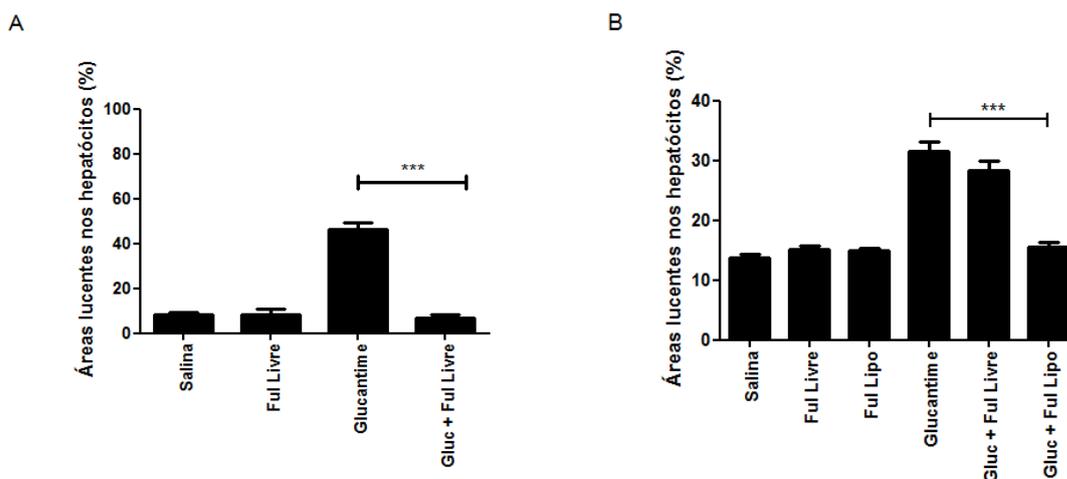


Figura 17: **Hepatoproteção do fulerol em modelo murino de LV submetido a quimioterapia antimonial.** Degeneração hidrópica no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L.infantum*, após 20 dias de tratamento por via intraperitoneal com: (A) glucantime (120 mg Sb/kg/dia), glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + fulerol livre (0,05 mg/kg/dose/dia), fulerol livre (0,05 mg/kg/dose/dia) ou salina; e (B) fulerol livre (0,05 mg/kg/dose/dia), fulerol lipo (0,05 mg/kg/dose/4 dias) glucantime (120 mg Sb/kg/dia), glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + fulerol (0,05 mg/kg/dose/4 dias), glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + fulerol em lipossomas (0,05 mg/kg/dose/4 dias) ou salina. ***P< 0,0001 com relação ao grupo glucantime, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

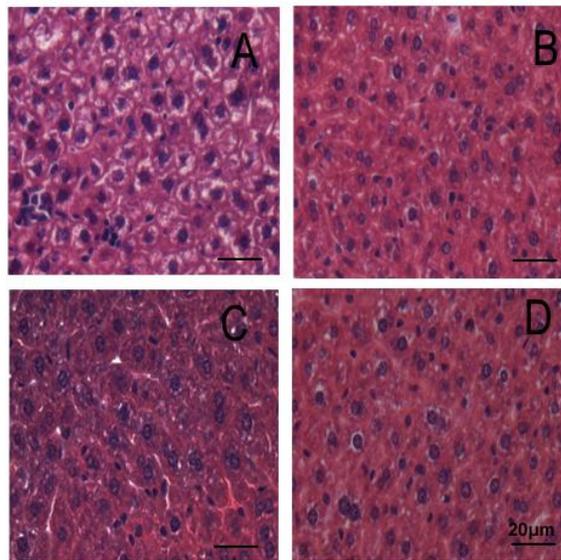


Figura 18: **Efeito do fulerol livre na degeneração hidrópica em hepatócitos de animais com *L. infantum***
 Micrografias em microscópio óptico de hepatócitos de camundongos BALB/c infectados com *L. Infantum* após tratamento IP com: A – Glucantime 120mg/kg/dia, B – Glucantime 120mg/kg/dia + Fulerol 0,05mg/kg/dia, Glucantime 120mg/kg/dia + Fulerol 0,05mg/kg/4 dias, C - Fulerol e D – Salina.

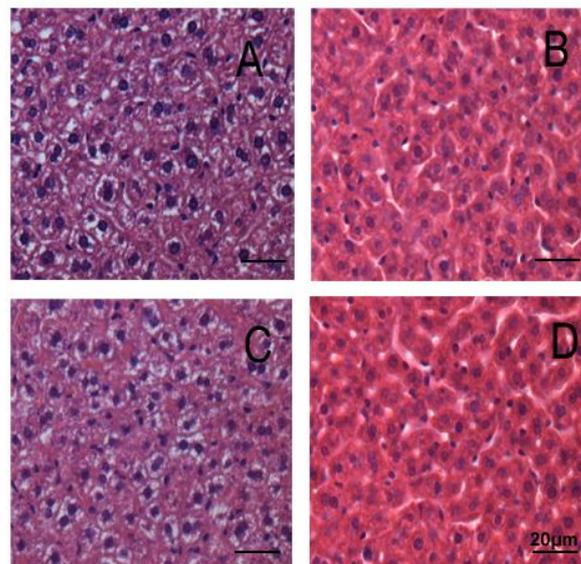


Figura 19: **Efeito do fulerol livre e encapsulado em lipossomas na degeneração hidrópica nos hepatócitos de animais com LV.** Micrografias em microscópio óptico de hepatócitos de camundongos BALB/c infectados com *L. Infantum* após tratamento IP com: A – Glucantime 120mg/kg/dia, B – Glucantime 120mg/kg/dia +

Fulerol 0,05mg/kg/4 dias em Lipossomas C- Glucantime 120mg/kg/dia + Fulerol Livre 0,05mg/kg/4 dias e D – Salina.

5.4.2 Índice apoptótico

O índice apoptótico dos hepatócitos também foi avaliado nos mesmos grupos experimentais, como parâmetro adicional, indicador de hepatotoxicidade. Já é sabido na literatura que o glucantime aumenta o número de células em apoptose no fígado de animais que recebem o antimonial (Kato et al, 2014). A Figura 20 (A e B) mostra a avaliação do índice apoptótico no tecido hepático em lâminas coradas em HE e coloração específica através da técnica de TUNEL (em C). Os grupos que receberam glucantime mostraram níveis de índice apoptótico significativamente mais elevados em relação aos demais grupos. Em A, o fulerol administrado todos os dias, associado ao antimonial, diminuiu significativamente esses níveis. Em B, o Fulerol foi administrado de 4 em 4 dias e avaliado na sua forma livre e encapsulada. No grupo que recebeu o fulerol não encapsulado, o índice apoptótico foi semelhante ao grupo que recebeu somente o glucantime. Entretanto, no grupo que recebeu o fulerol encapsulado em lipossomas, houve uma redução significativa desse índice apoptótico evidenciando uma hepatoproteção com uso do fulerol encapsulado em lipossomas.

A avaliação do índice apoptótico semi-quantitativamente pela técnica de TUNEL (C) mostrou resultados semelhantes aqueles mostrados em B, ou seja, o fulerol encapsulado em lipossomas reduziu significativamente o índice apoptótico. A prancha da figura 21, nos mostra a representação morfológica dos dados observados em C, em que o nº de núcleos marrons e cromatina condensada foram evidenciados em maior proporção no grupo glucantime. Esse resultado também foi semelhante ao observado no grupo que recebeu o antioxidante na sua forma livre no intervalo de 4 dias, mas não no grupo que recebeu o fulerol encapsulado em lipossomas.

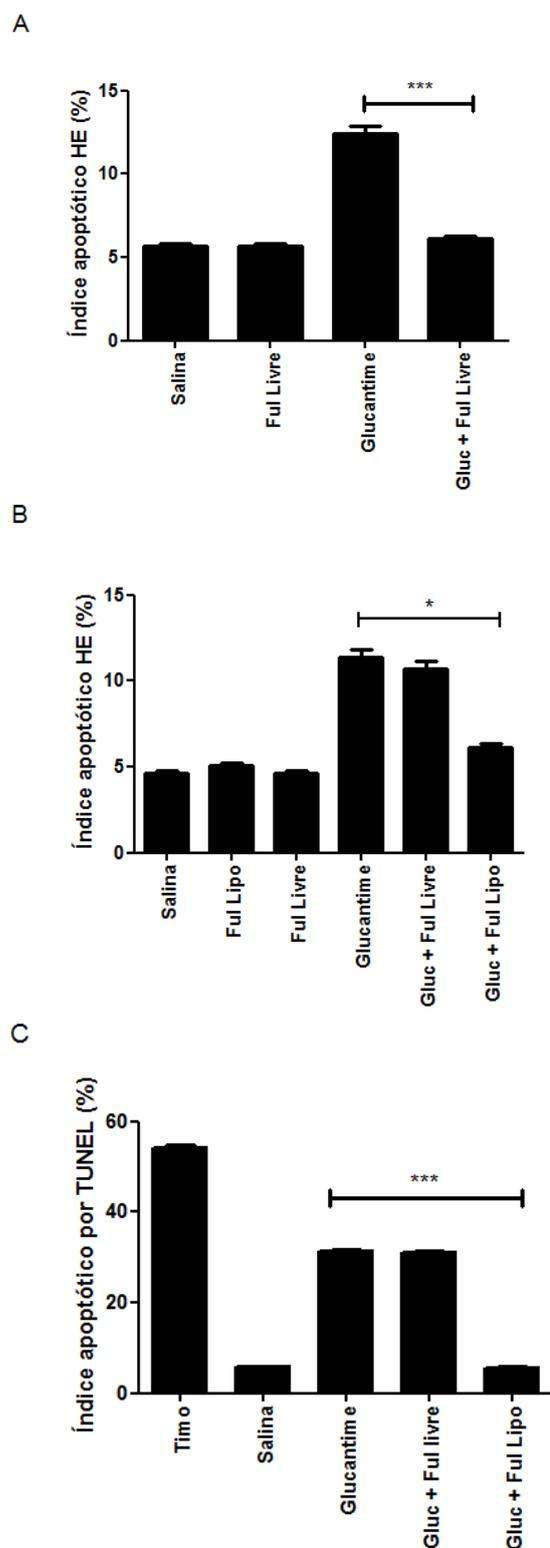


Figura 20. Efeito do fulerol na apoptose dos hepatócitos em modelo murino de LV submetido a quimioterapia antimonia. Índice apoptótico no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, após 20 dias de tratamento por via intraperitoneal com: (A) glucantime (120 mg Sb/kg/dia), glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + fulerol (0,05 mg/kg/dose/dia), fulerol 0,05mg/kg/dia ou salina; (B) Glucantime (120 mg Sb/kg/dia),

Glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + Fulerol Livre (0,05 mg/kg/dose/4 dias), Glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + Fulerol em lipossomas (0,05 mg/kg/dose/4 dias), Fulerol Livre (0,05 mg/kg/dose/4 dias), Fulerol Lipo (0,05 mg/kg/dose/4 dias), ou salina. Em (C) Glucantime (120 mg Sb/kg/dia), Glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + Fulerol (0,05 mg/kg/dose/4 dias), Glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + Fulerol em lipossomas (0,05 mg/kg/dose/4 dias) ou salina Sendo o timo controle positivo para marcação apoptótica. * $p < 0,05$ e * $p < 0,0001$ com relação ao grupo salina, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

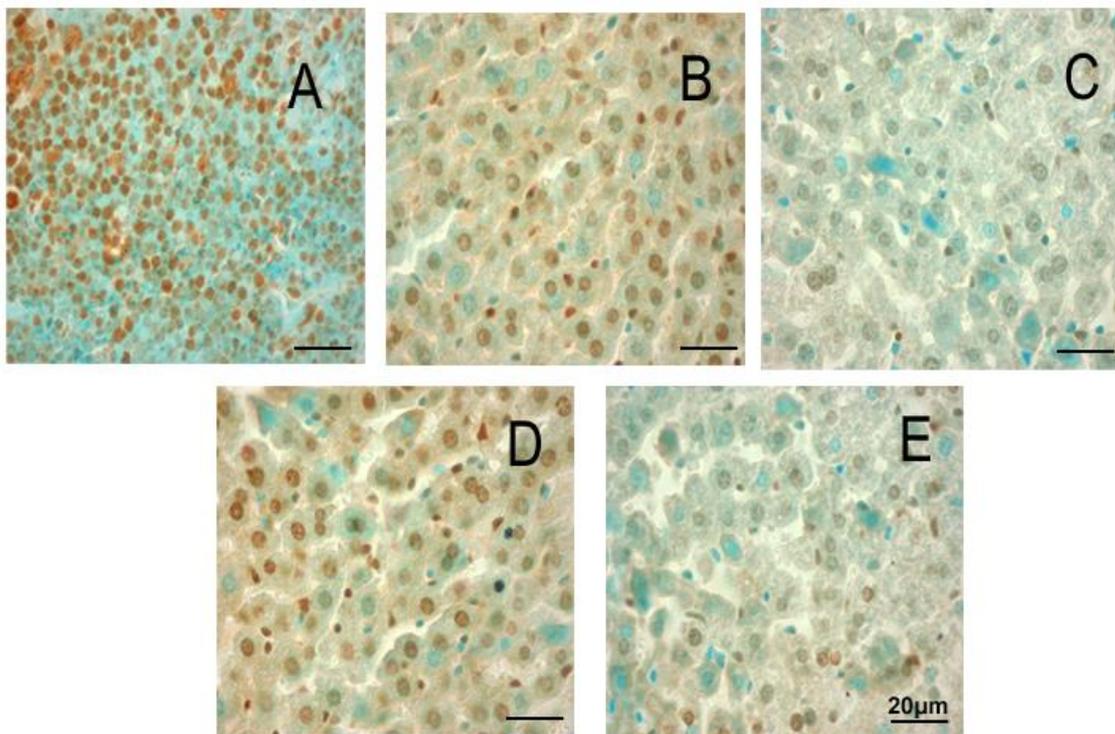


Figura 21: **Efeito do fulerol na apoptose dos hepatócitos, avaliada pela técnica de Tunel, em modelo murino de LV submetido a quimioterapia antimonial.** Micrografias em microscópio óptico do fígado de camundongos BALB/c infectados com *L.infantum*, após 20 dias de tratamento por via intraperitoneal com: A - Timo (controle positivo), B: Glucantime (120 mg Sb/kg/dia), D: Glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + Fulerol (0,05 mg/kg/dose/4 dias), C - Salina e E - Glucantime (120 mg Sb/kg/dia) + Fulerol em lipossomas (0,05 mg/kg/dose/4 dias). As células apoptóticas aparecem com núcleos marrons e cromatina condensada.

6. Discussão

Conforme os resultados encontrados nos estudos de eficácia do fulerol em modelos *in vitro* e *in vivo* de LV, foi possível a identificação de um novo fármaco antileishmania. Demonstramos, pela primeira vez, sua capacidade de reduzir a carga parasitária em modelo murino de LV de maneira pelo menos equivalente ao fármaco antimonial padrão Glucantime.

Esses resultados são surpreendentes se consideramos a atividade antioxidante do fulerol, que poderia resultar em maior proteção do parasito intracelular contra as ROS geradas pela célula hospedeira. A atividade *in vitro* do fulerol poderia ser explicada, seja por uma ação direta (leishmanicida) no parasito, pela ativação do fulerol pelo macrófago ou pela ativação da atividade microbicida do macrófago. A ausência de efeito do fulerol no crescimento da forma promastigota de leishmania na faixa de concentração estudada (dados não mostrados) sugere uma participação do macrófago.

É também interessante notar que a atividade antileishmania nos ensaios *in vitro* do fulerol foi observada em concentração elevada, dificilmente alcançável *in vivo*. Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar a discrepância entre a elevada atividade *in vivo* do fulerol e a sua baixa atividade *in vitro*. Os macrófagos teciduais nos animais infectados poderiam apresentar um estado de ativação diferente daqueles dos macrófagos peritoneais. O fulerol poderia sofrer uma ativação *in vivo*, sendo essa ativação menos pronunciada *in vitro*. Uma outra explicação possível seria uma ação imunomodulatória do fulerol, que resultaria na ativação dos macrófagos infectados. Segundo a literatura, a morte do parasito intracelular leishmania é favorecida por uma resposta imune do tipo Th1 onde há aumento de produção de citocinas como INF- γ e TNF- α e ação direta dessas sobre a atividade microbicida dos macrófagos infectados na LV murina (Stager e Rafati, 2012). A maior produção de NO e ROS por macrófagos (Kaye et al., 2004) ou ativação de linfócitos T para produção dessas citocinas é indicativo de imunomodulação protetora (Murray e Delph-Etienne, 2000).

Em 2008, Zhu e colaboradores relataram que o fulerol administrado na faixa de doses de 0,2mg/kg/dia - 1mg/kg/dia durante 17 dias estimula um aumento da capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoneais bem como acúmulo de linfócitos na área tumoral em modelo de hepatocarcinoma murino. Além disso, eles também observaram um aumento da produção da citocina TNF- α em cultura de macrófagos tratados com fulerol na faixa de concentração 0,015 e 0,06mg/ml.. Outros trabalhos também relataram o efeito do fulerol

sobre a produção de quimiocinas como CCL2, CCL3 e CCL5 no fígado de animais tratados com esse antioxidante (Bernardes, 2012) e na produção de neutrófilos (Jovanovic et al, 2011). Portanto, esses trabalhos sugerem uma ação direta do fulerol na função do macrófago e vários efeitos no sistema imune.

Portanto, com intuito de elucidar o mecanismo de ação do fulerol na LV, vários estudos *in vitro* e *in vivos* se fazem ainda necessários.

A utilização de nanossistemas carreadores de fármacos como os lipossomas encapsulando o fulerol demonstrou eficácia superior quando comparado ao uso do antioxidante na sua forma livre. Além disso, foi possível observar um efeito dose-dependente do antioxidante e a eliminação do parasito no fígado dos animais que receberam a maior dose de fulerol. Esse efeito dos lipossomas pode ser atribuído a sua capacidade de prolongar a permanência do fulerol no organismo e de o direcionar para os órgãos do sistema fagocítico mononuclear, principalmente o fígado, o baço e a medula óssea, aonde se localiza o parasito (Frezard e Demicheli, 2010). Como vantagem, o uso dos lipossomas permitiu a redução do número de doses e o aumento do intervalo entre as mesmas no tratamento da LV murina.

Em estudos futuros, esforços deverão ser desempenhados para melhor caracterizar a formulação quanto a taxa de encapsulação do fulerol, simplificar e tornar escalonável o processo de preparo da formulação e otimizar a sua eficácia através, por exemplo, do uso da mistura de lipossomas convencionais e peguilados (Azevedo et al., 2014) e da co-incorporação do fármacos lipofílicos, como a AmB e miltefosina.

Na avaliação de eficácia do fulerol associado ao glucantime, não foi observado um efeito aditivo significativo dos fármacos, sugerindo um possível efeito antagônico entre os dois compostos. Ademais, a ação antioxidante do fulerol poderia reduzir a atividade do glucantime que depende da indução de um estresse oxidativo para exercer sua atividade antileishmania. Outra explicação possível seria a menor captação hepática do Sb quando associado ao fulerol, mesmo se essa diferença não foi evidenciada em nosso estudo.

Uma das alterações histopatológicas mais comuns decorrente da toxicidade do antimonial nos hepatócitos dos animais tratados de forma sub-crônica é o aumento da área lucente dos hepatócitos decorrente de degeneração hidrópica (Kato et al., 2014). Essa degeneração em geral, acarreta à célula, uma diminuição do seu metabolismo celular

decorrente principalmente da lesão de enzimas responsáveis pelo equilíbrio osmótico celular provocada pelos radicais livres (Siqueira et al., 2005). A utilização de um antioxidante como o ácido ascórbico, se mostrou efetiva em reduzir os danos celulares provocados pelo antimonial em estudos anteriores (Kato et al., 2014). Portanto, uma vantagem esperada da associação do fulerol com glucantime poderia ser a redução da toxicidade do antimonial, em decorrência da potente ação antioxidante do fulerol. Este benefício foi claramente demonstrado neste trabalho, através da redução significativa da degeneração hidrópica dos hepatócitos no grupo que recebeu a associação. Já é sabido na literatura que o fulerol possui características hepatoprotetoras em outros modelos de toxicidade hepática mediada por estresse oxidativo, em roedores (Injac et al., 2008). No presente estudo, também avaliamos as alterações histológicas em órgãos como rins, pâncreas e baço, contudo, não encontramos nenhuma alteração histopatológica nos mesmos, que poderia ser explicado pela menor captação dos antimoniais pentavalentes nesses órgãos, quando comparados ao fígado (Carter et al., 1998).

Outro indicador de toxicidade investigado nos animais tratados com o glucantime foi a apoptose dos hepatócitos (Kato, 2014). Como resultado importante do nosso trabalho, demonstramos também que a utilização do fulerol livre (em doses diárias) e de lipossomas contendo fulerol (em doses a cada 4 dias) promoveu redução significativa do índice apoptótico, sendo que a forma lipossomal se mostrou ser mais efetiva que a forma livre, quando administradas nas mesmas condições. Esses resultados encontram-se em consonância com a literatura que mostra que o fulerol protege os tecidos contra danos celulares promovidos por radicais livres e reduz a apoptose de células neuronais submetidas a um estresse oxidativo (Kadish e Ruoff, 2000). Porém, o nosso trabalho relata, pela primeira vez, o benefício da forma lipossomal do fulerol na hepatoproteção, cuja eficácia pode ser atribuída a tendência natural dos lipossomas convencionais direcionarem o fármaco encapsulado para o fígado.

7. Conclusão

O presente trabalho permitiu:

- Identificar o fulerol como nova substância antileishmania, mostrando grande potencial como fármaco na terapia da LV;
- Evidenciar a hepatoproteção do fulerol em modelo murino de LV contra os efeitos deletérios do glucantime;
- Demonstrar que a utilização de nanocarreadores como os lipossomas aumenta a atividade antileishmania e a hepatoproteção do fulerol.

REFERÊNCIAS

- Aguiar MG, Silva DL, Nunan FA, Nunan EA, Fernandes AP, Ferreira LAM. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) major leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 64(6), 1234-40, 2009.
- Alvar J; Vélez ID; Bern C; Herrero M; Desjeux P; Cano J; Jannin J; Den-boer M. Who Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One** 7(5), e35671, 2012.
- Alves WA; Sena JM; Gomes MLS; Elkhoury ANSM. Leishmaniose: Situação atual no Brasil. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/ Departamento de Vigilância Epidemiológica/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, 2011.
- Amato VS. et al. Mucosal Leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 23, n. 9, p. 1026-34, 2009.
- Amato VS; Padilha ARS; Nicodemo AC; Duarte, MIS; Valentini, M. Use of Itraconazole in the Treatment of Muco-Cutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study, **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4(3), p. 153-157, 2000.
- Ballou WR, McClain JB, Gordon DM, Shanks GD, Andujar J, Berman JD, Chulay JD. Safety and efficacy of high-dose sodium stibogluconate therapy of American cutaneous leishmaniasis. **Lancet** 2, 13-6, 1987.
- Berman JD, Waddell D e Brian DH. Biochemical Mechanisms of the Antileishmanial Activity of Sodium Stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemother.** 27(6), p. 916-920, 1985.
- Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.** 24, p. 684-703, 1997.
- Bernardes PTT. Uso de nanocompostos como potencial estratégia farmacológica no controle da resposta inflamatória associada à doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) induzida em camundongos. **Dissertação de Mestrado**, 2012.
- Black CDV, Watson GJ, Ward RJ. The use of pentostam liposomes in the chemotherapy in experimental leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 71, p. 550-552, 1977

- Bretagne S, Durant R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A; Rivollet D, Vidaud M, Deniau M. Real time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in infected mice. **Clin Diagnos Lab Immunol**, 8, 828-31, 2001.
- Cagle DW, Thrash TP, Alford M, Chibante LPF, Ehrhardt GJ, Wilson LJ. Synthesis, Characterization, and Neutron Activation of Holmium Metallofullerenes, **J. Am. Chem. Soc.**:v.118, p. 8043-8047, 1996.
- Cagle DW; Alford JM; Wilson, LJ. Metallofullerene Sample Analysis by Mass Spectrometry (LD-TOF MS), Neutron Activation Analysis (NAA) and Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP AE), **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 5182–5187, 1999.
- Thrash TP, Cagle DW, Alford JM, Wright K, Ehrhardt GJ, Mirzadeh S, Wilson LJ. Toward. Fullerene-Based Radiopharmaceuticals: High Yield Neutron Activation of Endohedral ¹⁶⁵Ho Metallofullerenes, **Chem. Phys. Lett.** V. 308, p.329-336, 1999.
- Cameron, E., Pauling, L., Leibovitz, B. Ascorbic acid and cancer: a review. **Cancer Research**, 39(3), 663-681, 1979.
- Cameron, E., Pauling, L., Leibovitz, B. Ascorbic acid and cancer: a review. **Cancer Research**, 39(3), 663-681, 1979.
- Carter, K. C., Baillie, A. J., Alexander, J., & Dolan, T. F. The therapeutic effect of sodium stibogluconate in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* is organ-dependent. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 40(5), 370-373, 1988.
- Castro-Sousa F. et al. Dissociation between vasodilation and *Leishmania* infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n.7, p. 997-9, Oct 2001.
- Chiang LY, Lu FJ; Lin, JT. Free radical scavenging activity of water soluble fullereneols. **J Chem Soc Commun**, v.I, p. 1283-1284, 1995.
- Chulay JD, Spencer HC. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). **Am J Trop Med Hyg**, 34(4), 702-9, 1985.;
- Da Ros T, Prato M, Novello F, Maggini M, Banfi E. Easy Access to Water Soluble Fullerene Derivatives via 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azomethine Ylides to C₆₀. **J. Org. Chem.** ,v. 61, p.9070-9072, 1996.
- Da Silva SM, Amorim IFG, Ribeiro RR, Azevedo EG, Demicheli C, Melo MN, Tafuri WL, Gontijo NF, Michalick MSM, Frézard F. Efficacy of Combined Therapy with

- Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 2858-2867, 2012.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27, 305–18, 2004.
 - Desjeux P. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. **Med Mal Infect.** 35, 74-6, 2005.
 - Dordevic A, Bogdanovic G. Fullerenol: A new nanopharmaceutic? **Archive of oncology** 16, 42-45, 2008.
 - Fernandes, ALC, Waissman W. Interactions of carbon nanotubes and fullerenes with immune system of the skin and the possible implications related to cutaneous nanotoxicity. **Rev. Visa em debate**, Sociedade, Ciência e Tecnologia. vd. vli4.107pt, 2011.
 - Fernandes, F. R., Ferreira, W. A., Campos, M. A., Ramos, G. S., Kato, K. C., Almeida, G. G., Correa- Junior, J. D., Melo, M. N., Demicheli, C., Frézard, F. Amphiphilic antimony (V) complexes for oral treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 57(9), 4229-4236, 2013.
 - Freitas-Junior LH, Chatelain E KIM, H.A.; SIQUEIRA-NETO, J. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** 2, 2012.
 - Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, p. 2317-2336, 2009.
 - Frézard F, Demicheli C. 2010. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opin. Drug Deliv.** 7, 1343–58, 2010.
 - Frézard F, Michalick MSM, Soares CF, Demicheli C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate in liposomes. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 841-846, 2000.
 - Frezard F. et. al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v.28, p.511-18, 2005.
 - Frezard F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.32, p. 181-189, 1999.

- Garin YJ et al. A2 gene of Old World Cutaneous Leishmania is a single highly conserved functional gene. **BMC Infect Dis**, v. 5, p. 18, 2005.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of Cell Biology**, 119(3), 493-501, 1992.
- Gharbit N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F.[C60] Fullerene is a Powerful Antioxidant in Vivo with No Acute or Sub acute Toxicity. **Nano Letters**, Vol 5(12), 2578-85, 2005.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Mary Wilson E, Ho JL, Ribeiro de Jesus A, Carvalho EM and Almeida RP. 2007. Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide correlates with diseases severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases** p.1-12, 2007.
- Gontijo B; Carvalho MLR. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(1):71-80, 2003.
- Gonzalez, M. J., Miranda-Massari, J. R., Mora, E. M., Guzmán, A., Riordan, N. H., Riordan, H. D., Román-Franco, A. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. **Integrative Cancer Therapies**, 4(1), 32-44, 2005.
- Goodwin LC, Page JE. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem. J.** 22, 236-40, 1943.
- Grimaldi JR; Tesh RB; Mahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 41, p. 687-275,1989.
- Haldar AK, Sen P e Roy S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, p. 1- 23, 2011.
- Hashim FA. et al. Apparently successful treatment of two cases of post kala-azar dermal leishmaniasis with liposomal amphotericin B. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 89, n.4, p. 440, Jul-Aug 1995.
- Hepburn NC, Siddique I, Howie AF, Beckett GJ, Hayes PC. 1993 Hepatotoxicity of sodium stibogluconate in leishmaniasis. **The Lancet** vol. 342 (8865), 238-9, 1993.
- Higashi N; Inoue T; Niwa M. Immobilization and cleavage of DNA at cationic, self-assembled monolayers containing C60 on gold. **Chem. Commun**, p.1507-1508, 1997.

- Injac R, Martina P, Obermajer N, Djordevic-Milic V, Prijatelj M, Djordevic A, Cerar A, Strukelj B. Potential hepatoprotective effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. **Biomaterials**. 29 3451–3460, 2008.
- Jao Q, Li L, Mu Q, Zhang Q. Immunomodulation of Nanoparticles in Nanomedicine Applications. **BioMed Research International**. Article ID 426028, 2014.
- Jensen AW, Wilson SR, Schuster DI. Biological applications of Fullerene. **Biorg. Med. Chem.** 4, 767, 1996.
- Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barret MP, Madhubala R. Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 164,111–117, 1009.
- Jovanovic B, Anastasova L, Rowe EW, Palic D. Hydroxylated fullerenes inhibit neutrophil function in fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820) **Aquat Toxicol**. Jan 25;101(2):474-82, 2011.
- Kadish KM, Ruoff RS, editors. Fullerenes: Chemistry, physics and technology. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc; pp. 431–436, 2000.
- Kato et al. Protective Effect of Ascorbic Acid Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial. Jan, Vol 58, N 1 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 481– 488, 2014.
- Kato KC, Teixeira EM, Rabello ALT, Demicheli C, Correa-Junior JD, Reis PG, Silva Barcellos NM, Frezard F. Hepatoprotective effect of ascorbic acid during antimonial therapy of experimental visceral leishmaniasis. Resumo aceito para apresentação oral no **Worldleish5**, 2014.
- Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, 201, 239-253, 2004
- Lai, YL; Chiang LY. Water-soluble fullerene derivatives attenuate exsanguination-induced bronchoconstriction of guinea pigs. **J. Auton.Pharmacol**, v. 17, p. 229–235, 1997.
- Loiseau PM. et al. Pharmacomodulations on new organometallic complexes of Ir, Pt, Rh, Pd, Os: in vitro and in vivo trypanocidal study against *Trypanosoma brucei*. **Trop Med Parasitol**, v. 43, n.2, p. 110-4, Jun 1992.

- Magill, AJ. Epidemiology of the leishmaniasis. **Dermatol Clin**, v. 13, n. 3, p.505-23, Jul 1995.
- Marjukka ST, Bouwstra JA, Urtti A: Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **J Control Release** 59(2):149-161, 1999.
- Marques-da-Silva C, Chaves MM., Chaves SP, Figliuolo VR., Meyer-Fernandes JR., Corte-Real S, Coutinho-Silva R. Infection with *Leishmania amazonensis* upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. **Cellular Microbiology**, 13(9), 1410-1428, 2011.
- Marsden PD. Pentavalent antimonials: Old drug for new diseases. **Rev Soc Bras Med Trop** 18, 187–98, 1985.
- Martinez S., Gonzales M., Vernaza ME. Treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol and stiboglucanate. **Clin Infect Dis**, v. 24, n. 2, p. 165-9, Feb 1997.
- Mashino T; Okuda K, Hirota T, Hirobe M; Nagano T, Mochizuchi M. Inhibition of *E. coli* Growth by Fullerene Derivatives and Inhibition Mechanism. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.9, p. 2959-2962, 1999.
- Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR., Janoff, AS. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze–thawed multilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** 817, 193–196, 1985.
- Mbongo N. et al. In vitro sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. **Parasitol Res**, v.83, n. 5, p. 515-7, 1997.
- Moreira W, Leprohon P and Ouellette M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. **Cell Death and Disease** 2, e 201, 2011.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65(1), 55-63, 1983.
- Murray HW, Delph-Ethienne S. Visceral Leishmanicidal Activity of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in Mice Deficient in T Cells and Activated Macrophage Microbicidal Mechanisms. **Journal of Infection Diseases** 181, 795-799, 2000.

- Nayar R, Hope MJ, Cullis PR. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidyl cholines by extrusion technique. **Biochim. Biophys. Acta** 986,200–206, 1989.
- New RR, Chance ML, Thomas SC, Peters W. Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. **Nature**, v. 272, p. 55-56, 1978.
- Olivier M; Gregory DJ; Forget G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n.2, p. 293-305, 2005.
- Pimenta PF. et al. Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to the sand fly midgut. **Science**, v. 256, n. 5065, p. 1812-5, 1992.
- Rao LS, Hardy JG, Wilson CG. Tissue distribution and fate of free and liposome-encapsulated [¹²⁵Sb] sodium stibogluconate by gamma scintigraphy. **Int J Pharm**, v. 17, p. 283-290, 1983
- Ribeiro MDC, Coutinho LMB, Hilbig A. The role of apoptosis, cell proliferation index, bcl-2, and p53 in glioblastoma prognosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 62(2A), 262-270, 2004.
- Ribeiro RR, Moura P, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Demicheli C, Tafuri WL, Melo MN, Frézard F, Michalick MSM. 2008 Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 2564-2572, 2008.
- Ridley RG. Drug against Parasitic Diseases; FAILAMB, A.H. ; RIDLEY, R.G.; Vial, H. J., eds.; UNDP/World Bank/WHO **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)**: Geneva, p. 13, 2003.
- Sacks D; Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 453-83, 2001.
- Schettini DA, Costa-Val AP, Souza LF, Demicheli C, Rocha OGF, Melo MN, Michalick MSM, Frézard F. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 36, 269-272, 2003.
- Schettini DA, Ribeiro RR, Demicheli C, Rocha OG, Melo MN, Michalick MS, Frézard F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **International Journal of Pharmaceutics**, 315(1), 140-147, 2006.

- Schlein Y. Leishmania and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol Today**, v.9, n. 7, p. 255-8, 1993.
- Siqueira VJ, Taha MO, Fagundes DJ, Gomes PO, Juliano Y, Bruzzadelli MZ, Caputto LRG. Funcional and morphological study of the local and systemic hypothermia on dogs liver. **Acta Cir. Bras.** vol.20 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2005.
- Soares-Bezerra RJ, Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos / Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracelular molecules as a drug target **Rev. bras. Cienc. Farm.** 40, 139-49, 2004.
- Soini, Y., Pääkkö, P., Lehto, V. P. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. **The American Journal of Pathology**, 153(4), 1041, 1998.
- Srdjenovic B, Milic-Torres V, Grujic N, et al. Antioxidant properties of fullereneolC60(OH)24 in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin. **Toxicol Mech Methods** 20, 298–305, 2010.
- Stager S, Rafati S. CD8+ T cells in Leishmania infections: friends or foes? **Frontiers in Immunology** 3.1-8, 2012.
- Sueki K, Akiyama K, Zhao YL, Ito I, Ohkubo Y, Kikuchi K, Katada H; Nakahar M. Systematic Study of Lanthanoid Endohedral Metallofullerenes: Production Yields, HPLC Retention Time and Reactor Irradiation Effects. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 256, p.159-162, 2003.
- Sundar S; Mehta H; Chhabra A; Singh V; Chauhan V; Desjeux P; Rai M. Amphotericin B Colloidal Dispersion for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. **Clin. Infect. Diseases**, 42:608–13, 2006.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sendermann H, Fischer C, Junke K, Bryceson A, Berman J. Oral miltefosine for Indian Visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.** 347, 1739-1746, 2002.
- Sundar S. et al. Ambisome plus miltefosine for Indian patients with kala-azar. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 2, p. 115-7, Feb 2011.
- Takada H; Kokubo K; Matsubayashi K; Oshima T. Antioxidant Activity of Supramolecular Water-Soluble Fullerenes Evaluated by β -Carotene Bleaching Assay. **Bioscience Biotechnology**, 70 (12), 3088-3093, 2006.
- Tsai, MC; Chen YH, Chiang LY. Polyhydroxylated C60, Fullereneol, a Novel Free-radical Trapper, Prevented Hydrogen Peroxide- and Cumene Hydroperoxide-elicited

- Changes in Rat Hippocampus In-vitro. **JPharm Pharmacol**, v.49, n.4, p.438-445, 1997.
- Valladares JE, Riera C, Gonzalez-Ensenyat P, Diez-Cascon A, Ramos G, Solano-Gallego L, Gallego M, Portus M, Arboix M, Alberola J. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation. **Vet Parasitol**, v. 97, p. 15-21, 2001.
 - Vannier-Santos MA; Martiny A; De-Souza W. Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. **Curr Pharm Des**, V.8, n. 4, p.297-318, 2002.
 - Vesnina et al. Effect of fullerene C60 on functional activity of phagocytic cells. **Eksp Klin Farmakol**, 74(6):26-9. 2011
 - Vilenko B; Sienkiewicz A; Lekka M; Kulik AJ; Forro, L. In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C60. **Carbon**, v.42, p.1195-1198, 2004.
 - Wenzel, U., Nickel, A., Kuntz, S., Daniel, H. Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. **Carcinogenesis**, 25(5), 703-712, 2004.
 - www.dndi.org - Drugs for Neglected Diseases Initiative. <Acesso em 10 de Junho de 2014>
 - www.who.int - World Health Organization. <acesso em 10 de março de 2010>
 - www.who.int – World Health Organization. <acesso em 12 de junho de 2014>
 - Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen Leishmania donovani. **The Journal of Biological Chemistry** 279(38), 39925–32, 2004.
 - Wyllie S, Fairlamb AH. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line, **Biochem. Pharmacol.** 71, 257–267, 2006.
 - Yamakoshi Y; Umezawa N; Ryu A; Arakane K; Miyata N; Goda Y. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (c60) as potential medicines: O₂-versus 1o₂. **J Am Chem Soc**, v.125, p.12803-9, 2003.
 - Yudoh K, Karasawa R, Masuk K, Kato T. Water soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis. **International Journal of Nanomedicine**, v.4, p.217-225, 2009.

- Zhu et al. Tumor-Inhibitory Effect and Immunomodulatory Activity of Fullerol C₆₀(OH)_x. **Small**. 4, n. 8, 1168-1175, 2008.
- Zhu Z; Schuster D.I, Tuckerman ME. Molecular dynamics study of the connection between flap-closing and binding of fullerene-based inhibitors of the HIV-1 protease. **Biochemistry (Mosc)**.v. 42, p. 1326-1333, 2003.

ANEXOS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Frederic Jean Georges Frezard,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto **IMPACTO DE CO-TRATAMENTO COM O FULEROL NA TOXICIDADE E EFICÁCIA DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EM MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**, submetido a esta comissão pelo protocolo 46 / 2013, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 03/06/2013.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 04/06/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Pasta 595

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTÓTIPO 30/12/2013 014130002626
15:11 DEMG
BR 10 2013 033866 4

< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
- 1.2 Qualificação: Instil. de Ensino e Pesquisa
- 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
- 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil
- 1.5 CEP: 31270-901
- 1.6 Telefone: (31) 3409-4774
- 1.7 Fax: (31) 3409-6430
- 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

COMPOSIÇÕES ANTILEISHMANIA CONTENDO O FULEROL E USO

continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão:** do pedido Nº **Data de Depósito:**

5. **Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

continua em folha anexa

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTÓTIPO 30/12/2013 014130002626
15:11 DEMG
52400.08736.1/2013-11

ANEXO DE INVENTORES

Título: **COMPOSIÇÕES ANTILEISHMANIA CONTENDO O FULEROL**

Página 1

Nome: MAURÍCIO VELOSO BRANT PINHEIRO

Qualificação: PROFESSOR UNIVERSITÁRIO

CPF: 855.204.706-34

Endereço Completo: RUA ZILAH CORREIA DE ARAUJO, 179, APTO. 202, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.310-450

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@clit.ufmg.br

Nome: MARIA NORMA MELO

Qualificação: PROFESSORA UNIVERSITÁRIA

CPF: 006.569.506-25

Endereço Completo: PRAÇA NOVA YORK, 108, APTO. 202, BAIRRO SION, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30.315-550

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@clit.ufmg.br

Nome: PAULA PEIXOTO CAMPOS

Qualificação: PROFESSORA UNIVERSITÁRIA

CPF: 044.635.886-00

Endereço Completo: RUA CURRAL DEL REI, 597, APTO. 201, BAIRRO PADRE EUSTÁQUIO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30.720-220

Telefone: (31) 3409-4774

FAX: (31) 3409-6430

E-mail: patentes@clit.ufmg.br

Nome: MARINA DE SOUZA LADEIRA

Qualificação: PESQUISADORA

CPF: 045.735.596-47

Endereço Completo: RUA TARANTO, 144, BAIRRO BANDEIRANTES, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.340-550

Telefone: (31) 3409-4774

FAX: (31) 3409-6430

E-mail: patentes@clit.ufmg.br

Nome: LUIZ ORLANDO LADEIRA

Qualificação: PROFESSOR UNIVERSITÁRIO

CPF: 137.203.766-72

Endereço Completo: RUA TARANTO, 144, BAIRRO BANDEIRANTES, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.340-550

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@clit.ufmg.br